

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Katedra netkaných textilií

Sít'ování hydrofilních polymerů v nanovláknenných systémech

Crosslinking of hydrophilic polymers in nanofiber systems

Lenka Martinová

**HABILITAČNÍ PRÁCE
2007**

OBSAH:

Seznam zkratk	5
1. Úvod	7
2. Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning)	9
2.1. Princip elektrostatického zvlákňování	9
2.2. Vlastnosti polymerního roztoku pro elektrostatické zvlákňování	10
2.3. Vliv rozpouštědla na electrospinning	11
3. Příprava nanovláknenné vrstvy	16
4. Nanovláknna a tkáňové inženýrství	18
4.1. Tkáňové inženýrství a podpůrné struktury	18
5. Polyvinylalkohol (PVA)	20
5.1. Struktura a vlastnosti PVA	20
6. Následné síťování	21
6.1. Síťování chemickou reakcí funkčních skupin	22
6.2. Reakce polymerů a jejich specifičnost	22
6.3. Kinetika „nekatalyzované“ polyesterifikace polykarboxylové kyseliny	25
6.4. Síťování polyvinylalkoholu	27
6.4.1. Esterifikační reakce v nanovláknenném systému a ve filmu ze směsi PVA/PAA	27
6.4.2. Katalýza esterifikační reakce v nanovláknenném systému PVA/PAA	29
6.4.3. Hodnocení mechanických vlastností nanovláknenných vrstev	30
6.5. Síťování PVA aldehydy	32
6.5.1. Reakční mechanismus acetalizace	32
6.5.2. Stabilita zesíťování nanovláknenné vrstvy v závislosti na složení reakční směsi	36
7. Infračervená spektroskopie	37
7.1. Analýza IČ spekter PVA nanovláken	38
7.2. Analýza IČ spekter zesíťovaných nanovláknenných vrstev PVA	40
8. Superabsorpční polymery	44
9. MDOC (Micro-Dispersed Oxidised Cellulose - m•doc™)	46
9.1. Možnosti síťování MDOC	49
9.2. Elektrostatické zvlákňování směsi MDOC a PVA	51
10. Chitosan	53
10.1. Chování polyelektrolytu v nepřítomnosti soli a vliv soli na elektrostatické zvlákňování	54

10.2.	<i>Elektrostatické zvlákňování roztoků chitosanu</i>	55
10.3.	<i>Vliv povrchového napětí chitosanového roztoku na průběh electrospinningu</i>	58
10.4.	<i>Vliv molekulové hmotnosti chitosanu a stupně deacetylce na electrospinning</i>	59
10.5.	<i>Chitosanové hydrogely</i>	60
10.5.1.	<i>Stabilita chitosanových hydrogelů ve vodě</i>	65
11.	<i>Želatina</i>	69
11.1.	<i>Charakteristika želatiny</i>	69
11.1.1.	<i>Chemické složení želatiny</i>	70
11.1.2.	<i>Typická strukturní jednotka</i>	71
11.1.3.	<i>Molekulární struktura</i>	71
11.1.4.	<i>Rozpustnost želatiny</i>	72
11.1.4.1.	<i>Rozpustnost v roztocích obsahujících ionty</i>	73
12.1.4.2.	<i>Rozpustnost v nevodných rozpouštědlech</i>	74
11.2.	<i>Faktory ovlivňující gelaci</i>	74
11.3.	<i>Síťování želatiny</i>	75
11.3.1.	<i>Síťování epoxidy</i>	76
11.3.2.	<i>Síťování aldehydy a ketony</i>	77
11.3.3.	<i>Síťování různými oxidačními činidly</i>	79
11.3.4.	<i>Síťování za účasti enzymů</i>	80
11.3.5.	<i>Síťování genipinem</i>	81
11.3.6.	<i>Síťování UV zářením</i>	82
12.	<i>Nebulizace (atomizace)</i>	83
12.1.	<i>Excitační systém</i>	84
12.2.	<i>Průměr kapek</i>	84
12.3.	<i>Nebulizace organických kapalin</i>	87
12.4.	<i>Zvlákňování a aplikace nebulizace na PAA nanovláknenné vrstvy</i>	88
12.5.	<i>Laboratorní funkční model ultrazvukového nebulizeru</i>	90
13.	<i>Polyethylenglykol a polyethylenoxid</i>	93
13.1.	<i>Základní charakteristika PEO</i>	93
13.2.	<i>Zvlákňování PEO</i>	94
13.3.	<i>Síťování PEO</i>	96
13.3.1.	<i>Fotoiniciace</i>	96

13.3.2.	<i>Fotoiniciace s účastí fotosenzibilizátoru</i>	97
13.3.3.	<i>Přímá fotoiniciace</i>	97
13.3.4.	<i>Výsledky síťování PEO</i>	98
13.3.4.1.	<i>Síťování PEO UV zářením</i>	98
13.3.4.2.	<i>Síťování PEO gama zářením</i>	99
14.	<i>Závěr</i>	100
15.	<i>Použitá literatura</i>	103

Seznam použitých zkratk a symbolů

PVA – polyvinylalkohol

PVAc – polyvinylacetát

PAA – polyacrylic acid (polyakrylová kyselina)

HEMA – 2-hydroxyethylmethakrylát

EOMA – 2-etoxyethylmethakrylát

PMMA – polymethylmethakrylát

PLLA – poly-L-lactid acid (polymléčná kyselina)

PEO – polyethylenoxid

PS – polystyren

PE – polyethylen

TOS – p-toluensulfonová kyselina

SAP – superabsorpční polymer

CED – cohesive energy density (hustota kohezní energie)

E_{coh} – molární kohezní energie

F_s – Smalova molární atrakční konstanta

V_m – molární objem

δ – Hildebrantův parametr rozpustnosti

SEM – snímací elektronová mikroskopie

DDE – degree of deacetylation (stupeň deacetylace)

UV – ultrafialové záření

M_n – molekulová hmotnost číselná

M_w – molekulová hmotnost hmotnostní

HA – silná anorganická kyselina

MD – machine direction, orientace vlákenné vrstvy – podélný směr

MC – cross direction, orientace vlákenné vrstvy – příčný směr

KNT – Katedra netkaných textilií

SCPL – Solvent Casting & Particulate Leaching (lití rozpouštědla & vyluhování částic)

SEC – size exclusion chromatography (gelová chromatografie)

AMK – aminokyselina

Ala – alanin

Gly – glycin

Pro – prolin

Arg – arginin

Glu – glutamová kyselina

Hyp – hydroxyprolin

THF – tetrahydrofuran

MDOC – mikro-dispergovaná oxidovaná celulóza

fs – femto sekunda, femto= 10^{-15}

kGy – kiloGrey (jednotka pro gama záření)

NMR – nukleární magnetická rezonance

IR – infra-red spectroscopy (infračervená spektroskopie)

Mag. – magnification (zvětšení)

1. Úvod

Elektrostatické zvlákňování je komplikovaný proces, který slučuje aspekty polymerní nauky, fyziky elektrostatického pole, mechaniky kapalin, termodynamiky a několika dalších podoblastí inženýrských disciplín, umožňující výrobu polymerních vláken se submikronovým průměrem, a to vlivem vnějšího elektrického pole na polymerní roztok nebo taveninu.

Vláknenné vrstvy vytvořené ze submikronových vláken mají velký specifický povrch (řádově desítky až stovky $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) a malou velikost pórů ve srovnání s komerčními textíliemi. Právě to způsobuje, že jsou excelentními kandidáty pro aplikace ve filtraci (Jacobson 1991; Gibson a kol., 1999) a pro přípravu membrán. Dále nacházejí uplatnění v tkáňovém inženýrství (Huang a kol., 2000) a dalších bio-medicinálních aplikacích, výrobě ochranných oděvů, aplikaci pesticidů, solárních panelů a speciálních kompozitů (Berghoef, Vancso, 1999; Kim, Reneker, 1999).

Problematika síťování hydrofilních polymerů ve formě nanovláken začala být aktuální ve chvíli, kdy byla upřednostněna příprava nanovláken z vodorozpustných polymerů. V roce 2003 vznikla na Katedře netkaných textílií myšlenka připravit nanovlákná z polymerního roztoku metodou elektrostatického zvlákňování, a to bez zvlákňovací trysky. Tato myšlenka nabyla v roce 2003 podoby českého patentu (Jirsák a kol., 2003), v roce 2005 podoby mezinárodní patentové přihlášky (Jirsák a kol., 2005), v témže roce liberecká firma Elmarco poprvé vystavovala na světové výstavě (INDEX 2005, Ženeva) prototyp originálního strojního zařízení pro kontinuální elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků.

Ačkoliv v současné době není elektrostatické zvlákňování realizované výše zmíněnou metodou zdaleka omezeno jen na vodorozpustné polymery, zůstává tato problematika stále aktuální z ekologických i ekonomických důvodů.

Nanovláknenné vrstvy vyrobené z vodorozpustných polymerů, jako je např. polyvinylalkohol, polyethylenoxid, želatina, kyselina polyakrylová, nebo kopolymery na bázi poly (hydroxyethyl)methakrylátu jsou ve vlhkém a vodném prostředí velmi nestabilní, proto je nezbytné je stabilizovat proti rozpouštění následnou síťovací reakcí, která zajistí, že takto modifikovaná vlákna ve vlhkém nebo vodném prostředí pouze omezeně botnají.

Za optimálních podmínek obsahuje polymerní nanovlákná již při svém formování při electrospinningu všechny potřebné komponenty pro průběh síťovací reakce, tedy síťovací činidlo, případně katalyzátor nebo UV iniciátor a reakce proběhne po iniciaci

teplem nebo UV zářením. Některé polymerní síťovací systémy však není možné připravit před elektrostatickým zvlákňováním z důvodu téměř okamžité reakce komponent nebo proto, že některá z přidaných komponent brzdí průběh electrospinningu natolik, že vůbec neprobíhá. V těchto případech je možné síťování zrealizovat například tzv. mokrým způsobem ve druhé fázi (i) ponorem nanovlákněné vrstvy do lázně nerozpouštědla se síťovací komponentou, (ii) nanesením síťovací komponenty v podobě velmi jemné mlhy připravené ultrazvukovým nebulizerem (atomizerem).

První uvedený postup je velmi komplikovaný, protože vyžaduje manipulaci s nanovlákněnou vrstvou a její následné sušení, postup s využitím ultrazvukového nebulizéru je mnohem šetrnější a jeho úspěšnost byla experimentálně prokázána (Ultratec, 2006; Pokorný, Martinová, 2007).

Cílem práce je prostudovat různé typy síťovacích reakcí vodorozpustných polymerů v nanovlákněných systémech, zohlednit jejich specifickosti pro zamýšlené aplikace, vyhodnotit průběh těchto reakcí a experimentálně potvrdit jejich využitelnost.

2. *Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning)*

Základní idea elektrostatického zvlákňování se objevila před více než 70 lety. Od roku 1934 do roku 1944 Formhals publikoval sérii patentů (Formhals, 1934, 1939, 1940, 1943, 1944), kde popisuje experimentální uspořádání pro přípravu polymerních filament vlivem elektrostatických sil.

Renesance electrospinningu bývá spojována s pracemi Renekera a jeho spolupracovníků (Doshi, Reneker, 1995), kteří demonstrovali využití electrospinningu pro zvlákňování široké škály polymerů (Larondo, Manley, 1981). V devadesátých letech se výrazně zvyšuje množství publikací týkajících se electrospinningu, většina pochází z USA (81 %), o zbylá procenta se dělí v pořadí Korea, Německo a ostatních země (Zheng-Ming Juany a kol., 2003). Pojem „electrospinning“ odvozený od „electrostatic spinning“ začal být používán teprve nedávno, kolem roku 1995.

2.1. *Princip elektrostatického zvlákňování*

Princip je poměrně jednoduchý: polymerní filamenty jsou tvořeny z roztoku, umístěného mezi elektrodami opačné polarity, přičemž jedna elektroda je spojena s polymerním roztokem a druhá je připojena na kolektor, sloužící k ukládání vytvořených vláken. Roztok prochází úzkou tryskou, v momentě, kdy elektrostatické síly mezi hrotem trysky a kolektorem překonají povrchové napětí a viskoelastické síly, vzniká tzv. Taylorův kužel (Taylor, 1969), ze kterého se následně formuje submikronové vlákno. Vznik Taylorova kuželu je důsledek relaxace indukovaného náboje k volnému povrchu kapaliny na výstupu ze zvlákňovací trysky. Díky viskozitě polymerního roztoku a existenci zapletenin polymerních řetězců zůstává proud stabilní a nedochází k jeho transformaci do sférických kapek, jak se očekává u kapalinových válcovitých útvarů (Rayleigh, 1982). Rozpouštědlo se začíná ihned odpařovat. Rychlost nabitého polymerního útvaru se zvyšuje a jeho průměr ztenčuje v elektrickém poli, až narazí na uzemněnou protielektrodu kolektoru, na které se usazuje v podobě tenkých polymerních vláken. Za určitých podmínek se kapalinový proud stává nestabilní před dosažením kolektoru.

U nízkomolekulárních kapalin nebo u roztoků polymerů s nízkou molekulovou hmotností, ale i nízkou koncentrací, má počátek nestability za následek vznik malých nabitých kapek, v procesu známém jako elektrostatické rozprašování. Polymerní kapaliny jsou obvykle viskóznější než Newtonské kapaliny a jejich viskoelastické síly umožňují stabilizovat proud, což dovoluje formaci nabitých vláken.

Bylo zjištěno, že průměr vláken může být ovlivněn širokou škálou procesních a materiálových parametrů a může dosahovat až několik desítek nanometrů. (Bognitzki, 2000).

Definice nanočástic podle řady institucí je vztažena na útvary, jejichž alespoň jeden rozměr je menší než 100 nm (Royal Society, 2004; NSET – Nanoscale Science, Engineering and Technology; NSF – National Science Foundation). V této souvislosti si je autorka vědoma určité nepřesnosti, protože pojem nanovlákná je v práci používán i v případech, kdy průměry vláken jsou i několik set nanometrů a pod zmíněnými 100 nm se objevují spíše výjimečně. Přesnější by byl výraz submikronová vlákna, ale definice nanovláken bývá často v literatuře méně striktní a jako nanovlákná jsou běžně označována vlákna se submikronovým průměrem.

2.2. *Vlastnosti polymerního roztoku pro elektrostické zvlákňování*

Při elektrostickém zvlákňování je třeba ke každému polymernímu roztoku přistupovat zcela individuálně, a to jak při samotném zvlákňování, tak i při hledání optimální síťovací reakce. Proces je ovlivněn materiálovými i procesními parametry. Všechny dosud známé parametry jsou shrnuty v tab. 1.

POLYMER	ROZTOK	PROCES
Molekulová hmotnost	Typ rozpouštědla	Intenzita elektrického pole
Polydisperzita	Koncentrace roztoku	Vzdálenost elektrod
Teplota zesklnění	Viskozita	Rychlost vypařování rozpouštědla
	Povrchové napětí	Teplota a vlhkost vzduchu
	Rychlost toku	Technika ukládání
	Elektrická vodivost	Velikost kapiláry
	Teplota	

Tab. 1 Faktory ovlivňující electrospinning

2.3. *Vliv rozpouštědla na electrospinning*

V řadě prací (např. Subbiah, 2004; Jarusuwannapoom a kol., 2005) týkajících se electrospinningu se setkáváme s lakonickým sdělením, že polymer byl zvláknován z různých rozpouštědel nebo jejich směsí. Toto sdělení bývá doplněno charakteristikou průběhu procesu a popisem vzniklých vláken, což je bezesporu dobrý vstup a počátek pro kvalitativní vysvětlení pozorovaných efektů a jejich eventuální předpověď.

Rozpustnost polymerů se kvantitativně i kvalitativně liší od rozpustnosti nízkomolekulárních látek, pro které může být vyjádřena např. v gramech na litr rozpouštědla. U polymerů však nelze stanovit přesné hodnoty, protože přechod polymeru do rozpouštědla není ostrý. Polymery obecně nejprve v rozpouštědlech botnají, teprve potom se začínají rozpouštět. Pro rozpustné, tedy nezesíťované polymery, existuje často kritická rozpouštěcí teplota, pod kterou se systém rozděluje na dvě fáze – nerozpuštěný, nabotnalý polymer a téměř čisté rozpouštědlo (např. Morawetz, 1971; Tlustá, Zelinger 1971; Brandrup, 1975).

Z termodynamického hlediska je mírou afinity polymeru k rozpouštědлу změna Gibbsovy energie, vyvolaná vzájemným působením molekul rozpouštědla na elementy polymerního řetězce. Termodynamickou podmínkou vzájemné mísitelnosti dvou kapalin nebo rozpustnosti amorfního polymeru v rozpouštědle je záporná hodnota změny Gibbsovy energie při směšování za konstantní teploty a tlaku.

$$\Delta G_{\text{směs}} = \Delta H_{\text{směs}} - T \Delta S_{\text{směs}} < 0 \quad (1)$$

kde $\Delta G_{\text{směs}}$ je změna Gibbsovy směšovací energie ($\text{J} \cdot \text{cm}^{-3}$), $\Delta H_{\text{směs}}$ – změna směšovací entalpie ($\text{J} \cdot \text{cm}^{-3}$), $\Delta S_{\text{směs}}$ – změna směšovací entropie ($\text{J} \cdot \text{cm}^{-3} \text{K}^{-1}$), T – teplota (K). Čím je $\Delta G_{\text{směs}}$ zápornější, tím lepší je rozpustnost polymeru v daném rozpouštědle. Při botnání a rozpouštění polymeru roste entropie systému. Druhý člen pravé strany rovnice (1) bude tedy vždy negativní ($-T \Delta S_{\text{směs}} < 0$). Problém rozpustnosti je tedy především otázkou hodnoty $\Delta H_{\text{směs}}$. Pro splnění termodynamické podmínky rozpustnosti je nutné, aby $\Delta H_{\text{směs}}$, byla menší než součin teploty a změny entropie systému při směšování ($\Delta H_{\text{směs}} < T \Delta S_{\text{směs}}$). Podle Hildebranta a Scatcharda (1959) může být směšovací entalpie vyjádřena vztahem:

$$\Delta H_{\text{směs}} = (V_1 n_1 + V_2 n_2) [(\Delta H_{\text{vyp } 1} / V_1)^{1/2} - (\Delta H_{\text{vyp } 2} / V_2)^{1/2}] \phi_1 \phi_2 \quad (2)$$

kde V je molární objem složky ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), n – molární zlomek, $\Delta H_{\text{výp}}$ – změna vnitřní energie při vypařování ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$), ϕ – objemový zlomek složky, indexy 1 a 2 označují rozpouštědlo, resp. polymer.

Hodnota $\Delta H_{\text{výp}}/V$ (výparné teplo vztažené na jednotku objemu kapaliny) je u kapalin v dobré shodě s energií potřebnou k překonání všech kohezních sil v jednotce objemu látky a nazývá se hustota kohezní energie (CED). Vnitřní energie váže molekuly. Protože vypaření představuje dokonalé oddělení molekul, je výparné teplo (udávané v $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$) měřítkem pro energii, která musí být dodána 1 cm^3 kapaliny, aby byly překonány síly uvnitř rozpouštědla. Práce L_v vykonaná při izotermickém zvětšování objemu za konstantního tlaku nasycené páry p je dána vztahem:

$$L_v = p (V_{\text{pára}} - V_{\text{kapalina}}) \quad (3)$$

Změna vnitřní energie, při které se neuvažuje objemová práce za konstantního tlaku, bude

$$\Delta U = L - p (V_{\text{pára}} - V_{\text{kapalina}}) \quad (4)$$

Vnitřní výparné teplo se tedy rovná výparnému teplu zmenšenému o energii vynaloženou na objemovou práci.

Hildebrant (1950) představil koncept hustoty kohezní energie a rozpustnosti v sérii svých prací započatých v roce 1916. Parametr rozpustnosti (δ) představil později jako veličinu vztaženou k CED.

$$\delta = (\text{CED})^{1/2} \quad (5)$$

Rovnici (2) lze pak psát ve tvaru

$$\Delta H_{\text{směs}} = V_s (\delta_1 - \delta_2)^2 \phi_1 \phi_2 \quad (6)$$

kde V_s je molární objem směsi. Z rovnice (6) vyplývá, že takové rozpouštědlo, jehož parametr rozpustnosti bude shodný s parametrem rozpustnosti polymeru ($\delta_1 = \delta_2$), bude z hlediska rozpouštěcí schopnosti nejvýhodnější, protože směšovací entalpie má nejmenší

hodnotu ($\Delta H_{\text{směs}} = 0$). Parametry rozpustnosti je měřena velikost intermolekulárních sil uplatňujících se mezi molekulami kapaliny.

Parametr rozpustnosti je obvykle vyjádřen v $(\text{cal.cm}^{-3})^{1/2}$ nebo častěji v $(\text{J.cm}^{-3})^{1/2}$, $(\text{cal.cm}^{-3})^{1/2} \approx 2,05 (\text{J.cm}^{-3})^{1/2}$. Jednotky musí být vždy uvedeny.

Nyní uvažujme změnu entropie pro roztoky makromolekulárních látek a podmínky, za kterých polymer může být rozpuštěn v daném rozpouštědle. Z rovnice (1) je zřejmé, že ΔH je velmi malá. Musí být menší než $T\Delta S$, aby bylo dosaženo záporné ΔG a polymer byl rozpustný. Pro nepolární makromolekuly, které nevykazují speciální interakce s rozpouštědlem, je ΔH kladná a má také stejnou hodnotu entalpie mísení jako pro malé molekuly. Tímto je měřena síla intermolekulárních sil, uplatňujících se mezi molekulami v kapalině.

Parametry rozpustnosti jsou užitečné zejména při studiu rozpustnosti polymeru v daném rozpouštědle. Je třeba zdůraznit, že rovnice (6) je platná jen v případě roztoků, kde chybí silné interakce mezi polymerem a rozpouštědlem. V literatuře je publikována řada tabulek s hodnotami parametru rozpustnosti, které se od sebe liší. Pro zachování určité jednotnosti budou nadále zmiňovány hodnoty, které publikoval Vohlídal a kol., (1999).

Hildebrantova rovnice byla odvozena pouze pro nepolární systémy. V polárních systémech nebo tam, kde existují interakce mezi polymerem a rozpouštědlem, např. vazby vodíkovým můstkem, je hodnota parametru rozpustnosti odvozena velmi komplikovanými rovnicemi, které zde nebudou uváděny.

Z hlediska rozpustnosti lze jedno rozpouštědlo nahradit druhým, pokud je ve stejné kategorii podle síly vodíkových vazeb a pokud má blízký parametr rozpustnosti, případně i směsí dvou rozpouštědel, jejichž aditivně vypočtený průměrný parametr rozpustnosti se výrazně neodlišuje.

Pro polymery však nelze parametr rozpustnosti (δ) vypočítat stejným způsobem jako pro rozpouštědla, protože body varu a výparná tepla neexistují. Jejich hodnoty lze empiricky stanovit jako interval rozpustnosti pomocí známých hodnot (δ) rozpouštědel, která solubilizují nebo botnají polymer (Mleziva, 1993). Byly navrženy postupy (Vohlídal a kol., 1999), jimiž lze hodnotu kohezní energie a parametr rozpustnosti vypočítat z příspěvků jednotlivých chemických skupin bez přímého měření. Hodnoty molární kohezní energie (E_{coh}) pro celou řadu chemických skupin jsou tabelovány (Vohlídal a kol., 1999).

Parametr rozpustnosti (δ) pro polymery lze vypočítat podle vztahu (7) z odhadnutých hodnot E_{coh} – molární kohezní energie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) a V_m – molární objem kapaliny nebo viskózního či kaučukovitého polymeru ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$):

$$\delta = (E_{\text{coh}} / V_m)^{1/2} \quad (7)$$

nebo pomocí tzv. Smallových atrakčních konstant F_S ($\text{J}^{1/2} \cdot \text{cm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1}$), které jsou též tabelovány.

$$\delta = 1 / V_m \sum_i F_{Si} \quad (8)$$

Je známo, že roztoky řady polymerů snášejí velké přídavky nepravých rozpouštědel (nepravá rozpouštědla leží za hranicemi intervalu rozpustnosti nebo se silou vodíkových vazeb od polymeru výrazně liší, pravá rozpouštědla leží s hodnotami δ uvnitř intervalu rozpustnosti blíže středu). V mnohých případech takový přídavek dokonce zlepšuje rozpustnost polymerů a v extrémních případech lze polymer dokonce rozpustit ve směsi dvou nepravých rozpouštědel (Mleziwa, 1993).

Hodnota Hildebrantova parametru rozpustnosti směsí rozpouštědel může být určena z hodnot individuálních rozpouštědel (Burke, 1984). Např. dva díly toluenu a jeden díl acetonu bude mít Hildebrantův parametr rozpustnosti roven hodnotě 18,7, vypočteno z $(18,3 \times 2/3 + 19,7 \times 1/3)$, tedy roven hodnotě chloroformu. Teoreticky platí, že poměr 2/1 pro toluen/aceton bude vykazovat stejnou rozpouštěcí schopnost jako chloroform. Přitažlivé na této skutečnosti je to, že umožňuje předpovědět a priori rozpouštěcí schopnost směsi kapalin z jejich individuálních složek.

Další charakteristickou vlastností kapalin, která může výrazně ovlivnit electrospinning, je relativní permitivita. Je-li nepolární kapalina umístěna do elektrického pole, pouze elektrony v elektronovém obalu mohou zrealizovat odezvu na vnější elektrické síly, což vede k určité indukované polarizaci. Tím se vytváří relativní permitivita (ϵ_r), dříve dielektrická konstanta. Polární molekuly odpovídají na vnější elektrické pole svou reorganizací, která vede k podstatně vyšší relativní permitivitě. Zejména tam, kde se uplatňuje vliv vodíkových vazeb, je dosaženo vysokých hodnot dielektrické konstanty. Např. hodnota ϵ_r pro vodu je 80,4 při 25 °C. Jestliže je materiál s vysokou hodnotou dielektrické konstanty umístěn do elektrického pole, potom hodnota tohoto pole bude měřitelně redukována s objemem dielektrika.

Yilmaz (2002) zjistil, že ve směsi vody a alifatického alkoholu se realizují interakce, jako jsou vodíkové můstky mezi vodou a molekulami alkoholu. Tato skutečnost zřetelně ovlivňuje vlastnosti směsi voda a alifatický alkohol. Z alifatických alkoholů Yilmaz studoval chování methanolu, ethanolu a propanolu. Dielektrická konstanta a viskozita byly veličiny, jež smísení obou kapalin nejvíce ovlivnilo. Dielektrická konstanta směsi ethanol - voda v celém intervalu exponenciálně klesá, její hodnota pro ethanol je 20 při 20 °C.

Přestože vrstva polymerního roztoku je velmi slabá, experimenty při zvlákňování kyseliny polyakrylové (PAA), respektive její sodné soli, z vodno - ethanolického roztoku (10–20 hmot. % ethanolu) potvrdily, že tvorba Taylorových kuželů je při electrospinningu výrazně intenzivnější oproti zvlákňování z čistě vodného roztoku. To se projevilo nárůstem výkonu, vyjádřeným v gramech nanovláken vytvořených za jednotku času.

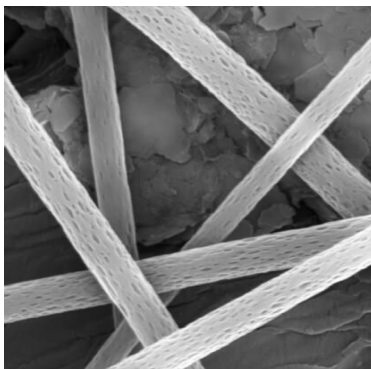
Neméně výrazný efekt vlivu přidaných ko-rozpouštědel byl pozorován při elektrostatickém zvlákňování poly(2-ethoxyethylmethakrylátu) (EOEMA), který je obvykle zvláknitelný z ethanolu. Byly hodnoceny vlivy přidavku různých ko-rozpouštědel (např. aceton, chloroform, dichlormethan, dichlorethan, ethylacetát) v množství 10–40 hmot. %.

Bylo též potvrzeno, že přidavek ko-rozpouštědla nejen ovlivňuje průběh electrospinningu ve smyslu výkonu, vyjádřeno v $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$, ale podílí se i na ovlivnění průměru vznikajících vláken, resp. nanovláken.

O přípravě porézních nanovláken s porozitou 90 % a více, jejichž příprava je založena na zvlákňování polymerní směsi PLLA/PEO a následném zbotnání a vymytí jedné komponenty, referuje Holzmeister a kol., (2006). Tento postup dovoluje výrazně zvýšit vnitřní povrch bez snížení celkové porozity a průměru póru ve vlákenné vrstvě.

McCann a kol., (2006) popisují metodu získávání porézních vláken založenou na termicky indukované separaci fází mezi oblastmi ve vláknu s vyšším a nižším obsahem rozpouštědla, které je následně ve vakuu odpařeno. Kolektor vláken je při tom umístěn do lázně s kapalným dusíkem.

V samotném počátku je na KNT studium možnosti ovlivnění porozity nanovláken použitým rozpouštědlem. První slibné výsledky byly pozorovány právě při výše zmíněném zvlákňování polyEOEMA, (obr. 1), a to ze směsi dichlormethan/methanol.



Obr. 1 SEM snímek porézních nanovláken z polyEOEMA, Mag. 10 000

Tyto výsledky dobře korespondují s prací Liu a Kumara (2005), kteří připravili porézní mikroskopické útvary při elektrostatickém zvlákňování polymethylmethakrylátu (PMMA) z roztoku nitromethanu. Také při zvlákňování roztoku PMMA v dichlormethanu se podařilo připravit porézní nanovlákná. Nebyly tak potvrzeny závěry Caspera a kol., (2004), kteří prováděli elektrostatické zvlákňování polystyrenu (PS) z tetrahydrofuranu (THF) a došli k závěru, že vznik póru v nanovlákněch je důsledek vlhkosti v atmosféře. Dayal a Kyu (2006) předpokládají, že proces vytváření mikrostruktury v průběhu elektrostatického zvlákňování je jakási soutěž mezi dynamikou separace fází a rychlostí vypařování rozpouštědla.

V průběhu vypařování rozpouštědla vzrůstá koncentrace polymeru v důsledku ztráty rozpouštědla z vlákněného rozhraní. Dynamika ztráty rozpouštědla z vlákněného rozhraní je vyjádřena Fickovou rovnicí (Bird a kol., 1960). Důsledkem ztráty rozpouštědla z fázového rozhraní se celkový objem vlákna, a tím i průměr vlákna, zmenšují. Není pochyb, že tato hypotéza je příliš jednoduchá, avšak Dayal a Kyu (2006) ji považují za dostatečnou pro objasnění zjištěné vlákněné morfologie. Tito autoři ve své teoretické studii prezentují možnost přípravy porézních vláken zohledňující relativní rychlost vypařování rozpouštědla. Na druhé straně vznik dvousložkové struktury může být důsledkem výchozích podmínek, kde proces separace fází je dominantní nad vypařováním rozpouštědla. Duté vlákno s gradientem morfologie vzniká, když proces vypařování rozpouštědla převažuje nad separací fází. Když je rychlost vypařování příliš vysoká, vyvine se velmi ostré rozhraní vytvářející duté vlákno.

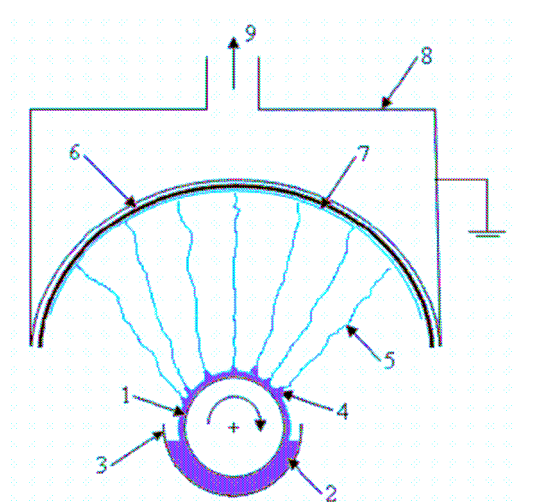
3. Příprava nanovlákněné vrstvy

Všechny nanovlákněné vrstvy diskutované v této práci byly připraveny na modelovém laboratorním zařízení označeném jako Nanospider, jehož princip je vysvětlen v patentu (Jirsák a kol., 2003, 2005). Schéma je uvedeno na obr. 2.

Jedná se o originální metodu pro výrobu vláken s průměrem v rozsahu od několika desítek nanometrů až po několik mikrometrů. Kovovým válečkem (1), který je zároveň

kladnou elektrodou, je vynášena ze zvlákňovaného polymerního roztoku (2) tenká vrstva, na které se vlivem silného elektrického pole (20–70 kV) vytváří tzv. Taylorovy kužely. Tyto útvary jsou účinkem přítomného elektrického pole prodlouženy a formovány do nanovláken, při čemž dochází též k vypaření většiny rozpouštědla. Formování optimálního množství Taylorových kuželů je ovlivněno také rychlostí otáčení válečku, která je přibližně $1,1 \text{ ot.min}^{-1}$.

Vzdálenost elektrod je obvykle 0,10–0,15 m. Minimální objem zvlákňovaného polymerního roztoku je 20 ml, což je ceněno zvláště v případech, kdy se pracuje s velmi drahými polymery, jejichž cena se pohybuje kolem 3–4 Euro za gram polymeru.



Obr. 2 Schématické znázornění principu zařízení Nanospider pro elektrostatické zvlákňování
1- otáčivý kovový váleček napájený stejnosměrným proudem, 2 – zvlákňovaný polymerní roztok, 3 – zásobní nádoba, 4 – Taylorův kužel, 5 – proud polymerního roztoku, 6 – nosná textilie, 7- nanovláknenná vrstva, 8- uzemněná sběrná clona (kolektor)
9 - odsávání vzduchu

V dalším textu jsou uvedeny vodorozpustné polymery, pro které byly hledány optimální podmínky síťovacích stabilizačních reakcí nanovláken, připravených elektrostatickým zvlákňováním polymerního roztoku. Jedná se zejména o polyvinylalkohol, kyselinu polyakrylovou, želatinu, chitosan a polyethylenoxid.

4. *Nanovláknna a tkáňové inženýrství*

Řada elektrostaticky zvláknovaných materiálů je svými vlastnostmi předurčena pro aplikace v biomedicině, zejména ve tkáňovém inženýrství. Může se jednat o materiály biodegradabilní, jako např. chitosan nebo kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) nebo polymery stálé v prostředí organismu, jako jsou např. kopolymery 2-hydroxyethyl-methakrylátu (Michálek a kol., 2005). V tomto směru probíhá s nanovláknennými vrstvami celá řada experimentů, jejich výsledky jsou průběžně vyhodnocovány a některé z nich byly již publikovány (Lesný, Syková, 2006; Filová, 2006; Rampichová, 2006).

4.1. *Tkáňové inženýrství a podpůrné struktury*

Nejprve musí být objasněno, proč byla jedna větev výzkumu elektrostatického zvláknování hydrofilních polymerů zaměřena právě na želatinu. Jedná se o přírodní polymer, který má předpoklady pro uplatnění v tkáňovém inženýrství, což je interdisciplinární obor, který vznikl sloučením oblastí buněčné biologie, inženýrství, materiálové vědy a chirurgie a vhodných biochemických faktorů s cílem zlepšit nebo opravit biologické funkce.

Pro regenerativní medicínu je často používáno synonymum tkáňové inženýrství (tissue engineering). V současné době probíhá řada výzkumů v oblasti opravy nebo náhrady např. kostí, chrupavek, cév, močového měchýře, šlach, atd. Specifikou těchto tkání jsou jejich mechanické vlastnosti.

Zájem o využití elektrostatického zvláknování v oboru biomedicíny významně narostl v posledních letech právě pro skutečnost, že vytvářená nanovláknna jsou slibnými kandidáty pro náhradu přírodních mimobuněčných maticí (extracellular matrix – ECM). Tří-dimensionální (3D) nanovláknenné struktury by se mohly stát analogy k přírodním mimobuněčným maticím, a to jak chemickým složením, tak i fyzikálními vlastnostmi. Důvodem je zejména jejich vysoká porozita, velký měrný povrch, orientace vláken a relativně snadná příprava. Růst buněk na podkladu z nanovláken je v řadě uváděných případů odlišný od jejich růstu na dvojrozměrném podkladu (Ahmed, 2005), růst některých buněk je závislý i na prostorovém uspořádání nanovláken (Yang, 2005).

V literatuře je zmiňována celá řada metod pro přípravu podpůrných struktur (scaffolds) pro tkáňové inženýrství. Vedle textilních technologií se jedná např. pevné pěny, emulzifikaci a následné vymražení, vyluhování částic anorganických solí z polymerní vrstvy (Solvent Casting & Particulate Leaching–SCPL). Každá z metod má své výhody, ale

i nevýhody. Kromě vrstev připravených při elektrostatickém zvlákňování byly též testovány struktury připravené klasickými technologiemi pro výrobu netkaných textilií, jako je naplavování i textilií vzniklými klasickými postupy – tkaní a pletení. V Ústavu biofyziky AV ČR a Ústavu neurověd 2. lékařské fakulty UK byla na těchto materiálech hodnocena především adheze buněk různých typů, zejména chondrocytů a hepatocytů a jejich proliferace a diferenciaci (Filová a kol., 2006). Při tvorbě nových tkání vytvořených po osazení scaffoldů buňkami musí být zajištěna efektivní penetrace buněk (vyjádřeno počtem buněk na cm^2), což vyžaduje, aby scaffold byl dostatečně porézní a měl velký měrný povrch. Výzkumy ukazují, že ideální porozita je nejméně 90 %. Ta umožňuje specifickou interakci scaffoldů – buňka, difúzi živin i odpadních látek, jakož i dostatečný prostor pro regeneraci mimobuněčnou matici (Agrawal, Ray, 2001).

Na výše zmíněných pracovištích byly hodnoceny nanovláknenné vrstvy z biodegradabilních polymerů, (např. kopolymer PLGA, PGA, kyselina hyaluronová, směsi PVA/chitosan), tak i z ne-biodegradabilních materiálů (kopolymer HEMA/EOMA a PEOMA).

Pro konstrukci scaffoldů a tkáňových krytů jsou v literatuře často zmiňována kolagenová vlákna (Cao a kol., 1995; Chaignaud a kol., 1997; Feed a kol., 1994) a želatina (Ito a kol., 2003). Protože se na pracovišti KNT dosud nepodařilo elektrostaticky zvláknit kolagen, byl výzkum zaměřen na jeho derivát – želatinu, pro kterou se podařilo nejen nalézt zvlákňovací podmínky, ale též byly učiněny první úspěšné kroky při jejím zesíťování (Komárek, Martinová, 2006). Dalším biodegradabilním polymerem, který je velmi zajímavý pro biomedicínální aplikace, je chitosan, jehož zvlákňování je popsáno v kapitole 10.2.

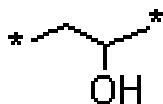
Příprava různých forem hmoty vyznačujících se přítomností pórů, respektive velkým měrným povrchem, který odpovídá rozměrům strukturních jednotek systému v řádu jednotek až stovek nanometrů, je v současné době v popředí zájmu materiálového inženýrství. Prakticky všechny důležité vlastnosti takových systémů se odvozují právě od mimořádně velkého měrného povrchu. Zatímco porézní materiály na bázi polymerů a nanomateriály připravované cestou organizovaných nadmolekulárních struktur jsou dlouhodobě zevrubně studovány, vláknům o průměru řádově v desítkách až stovkách nanometrů se věnuje zvýšená pozornost teprve v posledních pěti letech. Z těchto vláken lze přitom vytvářet vláknenné vrstvy s dobrými mechanickými vlastnostmi přímo v průběhu procesu zvlákňování. Mechanické vlastnosti i morfologie jsou příznivě ovlivněny

anizotropním charakterem vláknenné vrstvy. Póry v takových vrstvách mají specifickou geometrii, díky níž jsou povrchy vláken dobře přístupné.

Z hlediska buněčných kultur se nanovláknna přibližují struktuře extracelulární matrice. Tomu odpovídají pozorování vyšší adheze buněk k nanovláknům než v porovnání s vrstvami identických polymerů, a to jak ve formě 2D struktury homogenních fólií, tak ve formě 3D makroporézních materiálů (Min a kol., 2004; Schindler a kol., 2005; Rho a kol., 2006).

5. Polyvinylalkohol (PVA)

PVA je polymer, který je velmi zajímavý pro množství speciálních vlastností užitečných zejména pro biomedicínské a farmaceutické aplikace. Detaily týkající se jeho struktury, vlastností, syntézy hydrogelů, krystalizace a stejně tak aplikací podrobně popisuje např. Finch, (1973), Hassan a Peppas, (2000).



Obr. 3 Stavební jednotka PVA

5.1. Struktura a vlastnosti PVA

Polyvinylalkohol má relativně jednoduchou chemickou strukturu s opakující se hydroxylovou skupinou. Monomer vinylalkohol neexistuje ve stabilní formě, přeměňuje se na svůj tautomer, acetaldehyd. Proto je PVA připravován polymerizací vinylacetátu (PVAc) a následně hydrolyzován na PVA. Hydrolyza acetátových skupin rezultuje v polymer s určitým stupněm hydrolyzy, který závisí na podmínkách reakce. V podstatě je PVA tedy vždy kopolymerem PVA a PVAc. Komerční PVA, na který byl zpočátku soustředěn zájem naší laboratoře pro aplikaci polymerních roztoku v elektrostatickém zvlákňování, je dostupný ve dvou stupních hydrolyzy, a to $80 \pm 8 \%$ a $98,5 \%$. Stupeň hydrolyzy, determinující obsah acetátových skupin v polymeru, má zásadní vliv na chemické vlastnosti, rozpustnost a krystalinitu, ale i povrchové napětí (Tubbs, 1966; Mowiol PVA - Clariant, 1999).

Stupeň hydrolýzy a polymerizace ovlivňují rozpustnost PVA ve vodě (Finch, 1973). Je známo, že PVA s vyšším stupněm hydrolýzy je méně rozpustný ve vodě. Zbytkové hydrofobní acetátové skupiny ovlivňují intra a inter molekulární vodíkové vazby hydroxylových skupin. Doporučená teplota při rozpuštění PVA se stupněm hydrolýzy je 90 °C (Mowiol PVA - Clariant, 1999). Vliv stupně hydrolýzy se zřetelně projevil též při elektrostatickém zvlákňování, což může být vysvětleno vlivem stupně hydrolýzy na povrchové napětí polymerního roztoku (Kuraray, 1999).

6. Následné síťování

Vlákna, vytvořená při elektrostatickém zvlákňování vodných polymerních roztoků vyžadují tzv. následné síťování, jako nezbytný další reakční krok pro stabilizaci proti rozpouštění. Síťováním se rozumí vzájemné spojení řetězců kovalentními vazbami, při dosažení jejich kritické hodnoty je polymerní síť nerozpustná ve všech rozpouštědlech. Vzhledem k velké délce polymerních řetězců postačuje k vytvoření trojrozměrné sítě jen malé množství síťujícího činidla. Potřebné množství je tím menší, čím vyšší je molekulová hmotnost polymeru.

Ve studovaných nanovláknenných systémech bylo síťování řešeno především (i) s využitím funkčních skupin a (ii) rekombinací radikálů.

Síťovací reakce byly studovány a následně vyhodnocovány ve dvou formách polymerního materiálu – (i) ve filmech a (ii) v nanovláknenné struktuře. V závislosti na použité struktuře materiálu byly prokázány v průběhu síťovací reakce určité odlišnosti, v některých případech dokonce zcela zásadní rozdíly. Jedná se především o rozdílný vliv anorganické kyseliny, použité jako katalyzátor esterifikační síťující reakce při electrospinningu a ve formě filmu. Účinek iniciačního činidla při UV ozáření nanovláknenné vrstvy a filmu je také odlišný.

Pro hodnocení účinnosti síťovací reakce, respektive intenzity zesíťování, bylo využito rovnovážné botnání polymerní sítě vyjádřené v gramech absorbované kapaliny vztažené na 1 gram suchého polymeru, a to především u polymerů ve formě filmů. Pro hodnocení změn v morfologii vláken po expozici vodou byly využity také snímky z elektronového mikroskopu.

Stabilita polymerního roztoku, jež se požaduje po dobu alespoň 7 dnů, byla jednou ze základních podmínek přípravy polymerních síťujících systémů. Tím byla vyřazena některá velmi účinná síťovací činidla nebo bylo třeba vytvořit jiný způsob jejich aplikace,

to znamená až po elektrostatickém zvlákňování. Pro tento účel byla vyvinuta sestava pro tvorbu „studené mlhy“ obsahující ultrazvukový nebulizer (atomizer), ventilátor a odsávací zařízení, která umožňuje aplikaci síťovacího nebo aktivačního činidla s minimálním množstvím rozpouštědla, což velmi usnadňuje následné sušení.

6.1. *Síťování chemickou reakcí funkčních skupin*

Vodorozpustné polymery vděčí za svou rozpustnost přítomnosti funkčních skupin, zejména hydroxylových, karboxylových nebo aminových, které se mohou uplatnit při tvorbě gelu. Kovalentní vazby mezi řetězci mohou být vytvořeny při reakci funkčních skupin s komplementární reaktivitou, jako je např. reakce aminu s karboxylovou kyselinou nebo reakce isokyanátu s hydroxylovou nebo aminovou skupinou nebo při formování Shiffovy báze.

Při reakci těchto polymerů s vhodnými bi- nebo polyfunkčními sloučeninami jako jsou glykoly, bis-epoxydy, diisokyanáty, diaminy, dikarboxylové kyseliny, atd. vznikají příčné kovalentní vazby. Tyto reakce obvykle stačí aktivovat zahřátím na vyšší teplotu, případně přítomností katalyzátoru.

6.2. *Reakce polymerů a jejich specifičnost*

Poměry při chemických reakcích polymerů jsou zpravidla značně komplikovanější než při obdobných reakcích nízkomolekulárních látek. Zatímco při reakcích nízkomolekulárních látek lze zpravidla snadno oddělovat vedlejší produkty reakce a nezreagovaný materiál od hlavního produktu, u makromolekulárních látek není toto většinou možné. Na jedné makromolekule je řada reaktivních skupin, ale ne na všech dochází k žádané reakci, a to mimo jiné pro omezenou pohyblivost polymerního řetězce v pevném stavu a tím pro omezenou přístupnost reagujících funkčních skupin. Hlavním požadavkem při reakcích na polymerech tedy je, aby příslušná reakce probíhala pokud možno kvantitativně a byly co nejvíce potlačeny vedlejší reakce.

Ačkoliv se předpokládá se, že reaktivita funkčních skupin v polymeru je stejná jako reaktivita stejných skupin u nízkomolekulárních sloučenin, je v mnoha případech prokázáno, že reakční rychlost a maximum konverze pozorované u funkčních skupin na polymeru jsou podstatně odlišné od hodnot pozorovaných u nízkomolekulárních sloučenin. To je vyvoláno mimo již zmíněnou přístupností reakčních skupin, např. také změnou rozpustnosti produktu v původním reakčním systému nebo izolovaností funkčních skupin,

kteří již nemohou reagovat intramolekulárně. Nezanedbatelný je též vliv sousedních skupin, které sterickými nebo elektrostatickými efekty mohou ovlivňovat reakční rychlost. Vliv sousedních skupin vyplývá nejen z jejich charakteru, ale i ze stereochemie.

Konformační změny jsou ovlivněny jak stereochemií řetězce, tak volbou rozpouštědla. Zastínění funkčních skupin a tím ztížená reaktivita může být důsledkem více či méně svinutého polymerního klubka v roztoku. Pro úspěch reakcí na polymerech může být proto volba vhodného rozpouštědla a koncentračních poměrů rozhodující.

Při stejné koncentraci je pravděpodobnost intramolekulární reakce klubkových molekul větší ve špatných rozpouštědlech, než v rozpouštědlech dobrých. Prostorové uspořádání se zpravidla v průběhu reakce mění, takže reakce může být usnadněna nebo ztížena.

V případě síťování nanovláken v suchém stavu je pohyblivost polymerních segmentů oproti reakcím probíhajícím v roztoku velmi omezena a vzájemná dostupnost funkčních skupin může být velmi obtížná. Pro uspokojivé vlastnosti nanovláknenné vrstvy ve vlhkém nebo mokřém prostředí a potlačení jejich velké hydrofilnosti je však nezbytné, aby zreagovalo maximální procento hydrofilních skupin, a to z pohledu technologického pokud možno v minimálním možném čase. Proto bylo nutné se podrobně zabývat následným síťováním nanovláknenných vrstev ve vodě rozpustných polymerů.

Vodorozpustné polymery jako, jsou např. PVA, PAA, jsou velmi výhodné pro electrospinning nejen pro snadnou dostupnost, nízkou toxicitu a cenu suroviny, ale též z pohledu kinetiky síťovací reakce.

(i) Kondenzační reakce mezi hydroxylovými nebo aminovými skupinami a di- či polykarboxylovou kyselinou nebo jejími deriváty je často využívána při přípravě hydrogelů. PVA jako polyfunkční polymer poskytuje mnoho způsobů pro ovlivnění svých fyzikálních vlastností po chemické modifikaci. Velmi perspektivní je esterifikace PVA polyakrylovou kyselinou (PAA), která je v literatuře v souvislosti s electrospinningem zmiňována v mnoha příkladech (Kumeta a kol., 2003; Fei a Gu 2002; Hirai a kol., 2003). Síťování PVA nanovláken esterifikační reakcí s PAA nebo reakcí s jinou komponentou bylo nedávno uváděno v literatuře, ale bez systematického přístupu popisujícímu morfologii vlákna a jeho stabilitu proti rozpouštění ve vodě (Kurihara a kol., 1996; Gao a Seliskar 1998; Ding a kol., 2003; Kumeta a kol., 2003; Gogins a kol., 2002; Yao a kol., 2003).

Esterifikační reakce je obecně známa z organické chemie jako reakce kyseliny s alkoholem a je prokázáno, že její průběh podporuje přítomnost vodíkových iontů, jejichž zdrojem je obvykle silná minerální kyselina (HA), jako je kyselina sírová, chlorovodíková nebo fosforečná, která je přidávána do reakční směsi. Při polyesterifikaci PVA s kyselinou polyakrylovou (PAA) v nanovlákně vrstvě bylo zjištěno, že tato reakce probíhá i bez katalýzy H^+ ionty, ale v mnohonásobně delším čase.

Mechanismus esterifikace předpokládá adici protonu na kyslík karboxylové skupiny. Následujícím stupněm je nukleofilní reakce alkoholu s protonizovanou kyselinou, odštěpení protonu a vody a vznik esteru. Tyto klasické způsoby esterifikace se uplatňují u většiny monokarboxylových a polykarboxylových kyselin, pokud není karboxylová skupina stíněna sousedními objemnými skupinami (viz výše) nebo jinak stericky bráněna.

Polyesterifikaci karboxylové kyseliny katalyzovanou silnou kyselinou HA tedy lze popsat reakčním schématem (Vohlídal, 1995), které lze rozdělit do následujících kroků: (a) aktivace substrátu silnou kyselinou HA – s rychle se ustavující rovnováhou, (b) adice nukleofilu na aktivovaný substrát, jejíž rychlost je určující dějem, (c) přesmyk H^+ a eliminace H_2O z meziproductu a (d) eliminace H^+ , regenerace HA – charakterizována rychlým dosažením rovnováhy.

V podmínkách průběhu esterifikace v nanovlákněných systémech, kdy je z reakční směsi odstraňována vznikající voda při teplotě sušení (130–140 °C), dochází k posouvání rovnováhy žádoucím směrem. Určujícím krokem je rychlost druhé dílčí reakce (b), která je v řetězci následných dílčích reakcí nejpomalejší. Protože se jedná o elementární reakci, je její rychlostní rovnice, při aplikaci aproximace nezávislosti reaktivity skupin na délce skeletu molekuly, dána vztahem:

$$v = v_2 = k_2 [-C(OH)_2, A^-] \cdot [-OH] \quad (9)$$

kde $v = v_2$ je reakční rychlost a k_2 je rychlostní konstanta. Koncentrace aktivovaného substrátu je dána rychle se ustavující proteolytickou rovnováhou.

$$[R-C^+(OH)_2, A^-] = k_1 [HA] \cdot [-COOH] \quad (10)$$

Po dosazení (10) do (9) se získá rovnice ve tvaru:

$$V = k_2 \cdot k_1 [\text{HA}] \cdot [-\text{COOH}] \cdot [-\text{OH}] \quad (11)$$

Aby stabilizace PVA nanovláknna proti rozpouštění ve vodě byla dostatečně efektivní, musí reakční směs obsahovat ekvimolární množství reagujících funkčních skupin, což lze se dostatečnou přesností vypočítat ze známých koncentrací reagujících komponent, v uváděném případě PVA a PAA.

Z hlediska kinetiky je rozhodující teplota sítování, kterou je třeba volit tak, aby nedocházelo k degradaci polymerů, a tím k jejich nežádoucím barevným změnám. Maximální použitelnou teplotou je 140 °C, ale jen po omezenou dobu. Přítomností kyseliny jako katalyzátoru esterifikace může být zredukována doba sítování až o 50 %. Při obsahu PAA 50 hmot. %, 8 hmot. % kyseliny fosforečné a teplotě 140 °C byla určena doba sítování 2 min.

6.3. Kinetika „nekatalyzované“ polyesterifikace polykarboxylové kyseliny

Tak zvaná nekatalyzovaná polyesterifikace je ve své podstatě také kysele katalyzovanou reakcí. Funkci katalyzující kyseliny však přebírá karboxylová skupina přítomná v reakční směsi. Reakční schémata nekatalyzované a katalyzované polyesterifikace jsou v zásadě shodná, s tím rozdílem, že aktivace substrátu probíhá jako autoprotolýza (autoiniciace) karboxylových skupin, a že párovými ionty jsou karboxylátové anionty $-\text{COO}^-$.

Další dílčí kroky reakčního mechanismu jsou stejné. Pro rovnovážnou koncentraci substrátu, která je řízena autoprotolytickou rovnováhou však bude platit

$$[-\text{C}^+ (\text{OH})_2, \text{COO}^-] = k_s [-\text{COOH}]^2 = k_s c^2, \quad (12)$$

pro celkovou rychlost v nekatalyzované polyesterifikace dostaneme vztah

$$v = -d_c/d_t = k_2 k_s c^3, \quad (13)$$

jehož integrace v mezích c_0 do c_t vede k :

$$1/c_2 = 1/c_0^2 + 2 k_2 k_c t \quad (14)$$

Z dat vynesných podle rovnice (14) zjistíme hodnotu součinu $k_2 k_c$ a autoionizační konstantu karboxylů na daném typu molekulárního skeletu zjistíme nezávislým měřením, čímž se dostaneme i k hodnotě k_2 .

Kinetiku chemických reakcí probíhajících v soustavách, jejichž složení je dostatečně vzdálené od rovnovážného stavu, lze velmi často popsat rovnicí ve tvaru

$$V = k_{\text{exp}} \cdot [A]^{\alpha} \cdot [B]^{\beta} \cdot [C]^{\gamma}, \quad (15)$$

kde k_{exp} je experimentální rychlostní konstanta úhrnné reakce a α, β, γ jsou dílčí reakční řády odpovídajících složek reakční směsi. Součet dílčích reakčních řádů je potom řádem reakce.

Pro nekatalyzovanou esterifikaci je dílčí řád vůči $[-\text{COOH}]$ roven 2, vůči $[-\text{OH}]$ je roven 1. Celkový řád reakce ρ je roven 3. Pro esterifikaci katalyzovanou silnou kyselinou HA jsou dílčí reakční řády jednotkové a celkový řád reakce je též 3. Protože však analytická koncentrace katalyzující HA v soustavě se v průběhu reakce nemění, může být zahrnuta do experimentální rychlostní konstanty.

$$k'_{\text{kat}} = k_{\text{kat}} \cdot [\text{HA}] \quad (16)$$

Katalyzovaná esterifikace pak bývá označována jako reakce 2. řádu, protože ji popisuje rychlostní rovnice:

$$V_{\text{kat}} = k'_{\text{kat}} \cdot [-\text{COOH}] \cdot [-\text{OH}] \quad (17)$$

Z hlediska kinetiky esterifikační reakce je rozhodující teplota síťování, kterou je třeba volit tak, aby nedocházelo k degradaci polymerů a tím k jejich nežádoucím barevným změnám. Maximální použitelnou teplotou je pro PVA 140 °C, ale jen po omezenou dobu.

Přítomnost kyseliny jako katalyzátoru esterifikace může být zredukována doba síťovací reakce až o 50 %. Při obsahu PAA 50 hmot. %, 8 hmot. % kyseliny fosforečné a teplotě 140 °C byla experimentálně zjištěna doba síťování 2 min.

6.4. Síťování polyvinylalkoholu (PVA)

PVA musí být pro řadu aplikací, především v medicíně a farmacii účinně zesíťován. Hydrogel může být popsán jako hydrofilní zesíťovaný polymer, který botná, je-li umístěn do vody nebo biologického fluida (Peppas, 1987). Zůstává však nerozpustný v důsledku zesíťování.

Síťování PVA je relativně dobře zmapováno. Využívají se při něm zejména tři postupy: (i) síťování esterifikační reakcí a (ii) síťování s aldehydy, (iii) síťování gama zářením.

6.4.1. Esterifikační reakce v nanovlákněném systému a filmu ze směsi PVA/PAA

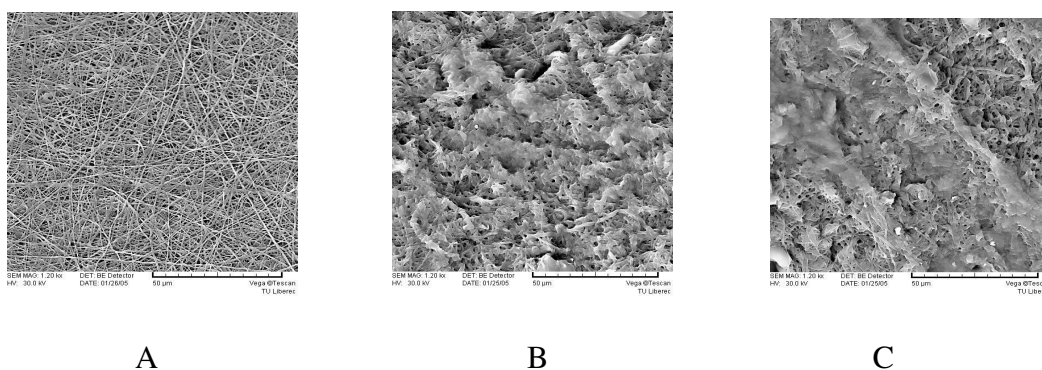
Jak bylo již zmíněno výše, katalýza esterifikace je prováděna silnými minerálními kyselinami. Paralelně se studiem průběhu reakce v nanovlákněném systému byly síťovací reakce prováděny i ve filmech, připravených ze stejných polymerních roztoků, které byly používány při electrospinningu. Takto připravené filmy sloužily k hodnocení stupně síťování, které bylo vyjádřeno hodnocením rozpustnosti, respektive sorpcí destilované vody, kterou přijaly připravené filmy za daný čas – vyjádřenou v gramech vody na 1 gram suchého polymerního materiálu

Již při těchto jednoduchých experimentech byly pozorovány zřetelné rozdíly v průběhu síťovací reakce v nanovlákněné vrstvě a filmu. Např. bylo zjištěno, že katalýza kyselinou chlorovodíkovou ve fólii je velmi účinná, ale v nanovlákněném systému se její vliv vůbec neprojevil. V hodnocení průběhu reakce není uvažován rozdíl v hmotnostech a specifických površích obou systémů. Vysvětlení lze hledat v nestabilitě kyseliny chlorovodíkové a jejímu vytékání z tuhnutí nanovlákněného systému v průběhu electrospinningu.

Pro katalýzu byla pak využívána kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4), která kromě své katalytické funkce a vlivu na zvýšení vodivosti elektrostaticky zvlákněvaného systému, vzhledem ke své disociaci, vytváří s PVA organoestery, které byly prokázány pomocí spekter FTIR (Martinová, Přádný 2004).

Zeng a kol., (2004) se zabývali vlivem molekulové hmotnosti PAA a koncentrace katalyzátoru, v tomto případě kyseliny p-toluensulfonové (TOS), na stabilitu

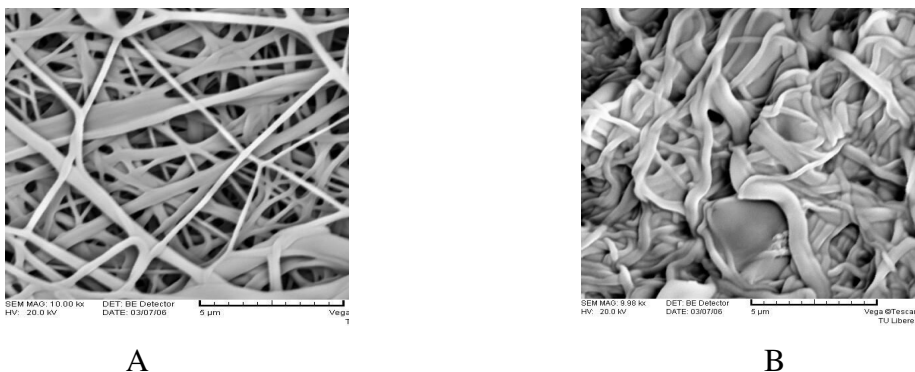
elektrostaticky připravených nanovláken z PVA a stabilizovaných síťovací esterifikační reakcí. Autoři srovnávali PAA s molekulovou hmotností M_w 1000; 100 000 a 250 000 g.mol^{-1} při katalýze až s 5 % TOS a dospěli k závěru, že vysoká molekulová hmotnost použité PAA rezultuje ve vyšší stabilitu vlákna. Ze srovnávacích experimentů, které jsme prováděli na našem pracovišti vyplývá, že pro tento vliv je určitou hranicí PAA s M_w kolem 100 000 g.mol^{-1} . Experimenty byly realizovány s PAA různých molekulových hmotností: 70 000, 100 000 a 143 000 g.mol^{-1} (Eastman Sokolov) a PAA s M_w 100 000 a 250 000 g.mol^{-1} (BASF) a Sokratem 72 (Eastman Sokolov), což je komerční produkt, jehož podstatou je vodný roztok sodné soli kopolymeru kyseliny akrylové a kyseliny maleinové, odebraný z reaktoru před neutralizací. Zengem (2004) zmiňovaná excelentní stabilita nanovláken po 24hodinové expozici vodě (20 °C) nebo páře (1 hod, 95 °C) na přiložených SEM snímcích není podle mého názoru zcela věrohodná, protože příliš velké vzdálenosti mezi vlákny zabraňují kumulaci vláken po jejich nabotnutí. Stran stability vlákněných vrstev jsou naše výsledky plně srovnatelné (obr. 4). Morfologie vlákněné vrstvy, katalyzované kyselinou fosforečnou a TOS, po 24 hod působení vody při laboratorní teplotě, neprokázala žádný výrazný efekt použité TOS ani na srážlivost vlákněných vrstev při esterifikační reakci, ani na stabilitu struktury vlákněné vrstvy. Jediným pozitivem je, že při tepelně aktivovaném síťování nedochází při aplikaci TOS ke změně barvy polymeru, který může být v případě aplikace H_3PO_4 nažloutlý až nahnědlý, v závislosti na teplotě.



Obr. 4 SEM snímky nanovlákněné vrstvy z PVA (58 hmot. %)+PAA (37 hmot. %)+ H_3PO_4 (5 hmot. %)

A – za sucha, B – po kontaktu s vodou a následném usušení (20 °C -10 min), C – po kontaktu s vodou a následném usušení (var –10 min). Mag. 1200x

Cílem stabilizace nanovláknenných vrstev je nejen zajištění jejich nerozpustnosti, ale také maximální zachování vláknenné struktury. Zatímco u všech popisovaných vrstev byla dosažena nerozpustnost, testovaná ve studené i horké vodě, dokonale zachovanou strukturu vláken se nepodařilo dosáhnout ani při ekvimolárním poměru PVA a PAA (obr. 4, obr. 5).



Obr. 5 SEM snímky PVA/PAA nanovláknenných vrstev, A – za sucha, B – po kontaktu s vodou a následném usušení (23 °C po 24 hod), Mag. 10 000x

6.4.2. Srážlivost nanovláknenných vrstev při síťovací reakci

Srážlivost nanovláknenných vrstev může být sledována ze dvou hledisek: (i) v průběhu síťovací reakce, (ii) při kontaktu vláknenné vrstvy s vodou nebo vodní párou.

(i) Srážlivost vláknenných vrstev při síťující reakci může být z technologického pohledu při kontinuálním způsobu výroby značná komplikace. Srážlivost nanovláknenných vrstev při síťovací reakci je značně ovlivněna nejen koncentrací PAA ve zvlákněvané směsi, ale zejména teplotou síťování a účinností fixace. Byly hodnoceny vzorky s obsahem PAA 18, 33, 46, 57, 67 hmot. %.

Jednoznačně bylo prokázáno, že srážlivost vrstev se zvětšuje s obsahem PAA. Za předpokladu, že se požaduje maximální efektivnost reakce, tj. zreagování všech hydroxylových skupin na PVA, jež jsou příčinou botnání vláken ve vodném prostředí, reakce vyžaduje přítomnost 62 hmot. % PAA.

Při vhodně provedené fixaci mohou být rozměrové změny (i) při maximálním sledovaném obsahu PAA (67 hmot. %) relativně malé, tj. 0–25 % v jednom směru (hodnoceno v MD a CD na čtverci 10 x 10 cm).

(ii) Srážlivost ve vodném prostředí. Z dosud nepublikované naší práce vyplývá, že srážlivost vláknenných vrstev ve vodném prostředí může být významně potlačena až zcela eliminována při zvlákněování interpenetrujících směsí polymerních roztoků. Bylo

prokázáno, že 10 hmot. % přídavek roztoku polyethylenoxidu (PEO) do ethanolicko-vodného roztoku kopolymeru HEMA/EOMA významně snižuje srážlivost. Zjištěný efekt roste s rostoucí molekulovou hmotností PEO, při čemž nulové srážlivosti bylo dosaženo při aplikaci PEO s M_w 900 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Lze předpokládat, že dochází k vodíkovým vazbám mezi ethericky vázaným atomem kyslíku v PEO a vodíkovým atomem hydroxylové skupiny v kopolymeru HEMA. Tyto vodíkové vazby patrně způsobují fyzikální zesíťování kopolymeru HEMA/EOEMA s PEO na podobném principu jako je tvorba polyelektrolytových komplexů, jejichž pevnost je na molární hmotnosti velmi silně závislá (Platě a kol., 1977). Za předpokladu, že nebude použito ekvimolárního poměru PVA a PAA, lze očekávat stejný fixující efekt vyvolaný přítomností PEO v nanovlákně vrstvě i v tomto případě.

6.4.3. Hodnocení mechanických vlastností nanovlákněných vrstev

Na vyrobených nanovlákněných vrstvách bylo měřeno prodloužení v suchém i mokřém stavu vzorků, bylo vypočítáno poměrné prodloužení ϵ a jednotlivé hodnoty byly vynášeny do grafu v závislosti na relativním prosloužení a na napětí. K posouzení výsledných vlastností byl zaveden tzv. smluvní modul (**SM**), který byl získán jako rozdíl mezi suchým (**M_S**) a mokřým (**M_M**) modulem. Z grafu závislosti smluvního modulu na druhu síťujícího činidla (obr. 6) je zřejmé, že vrstvy síťované glyoxalem vykazují nejvyšší modul, přestože obsah síťující komponenty byl ve srovnání s obsahem PAA velmi nízký.

Použité síťující komponenty

Sokrat 32 – komerční produkt Eastman Sokolov, sodná sůl kyseliny polyakrylové – pro experiment byl využit jen částečně zneutralizovaný meziprodukt, relativní molekulová hmotnost přibližně 13 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, obsah sušiny 39–41 hmot. %.

Sokrat 32 SV – komerční produkt Eastman Sokolov, sodná sůl kyseliny polyakrylové – pro experiment byl využit jen částečně zneutralizovaný meziprodukt, relativní molekulová hmotnost přibližně 70 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, obsah sušiny 32–35 hmot. %.

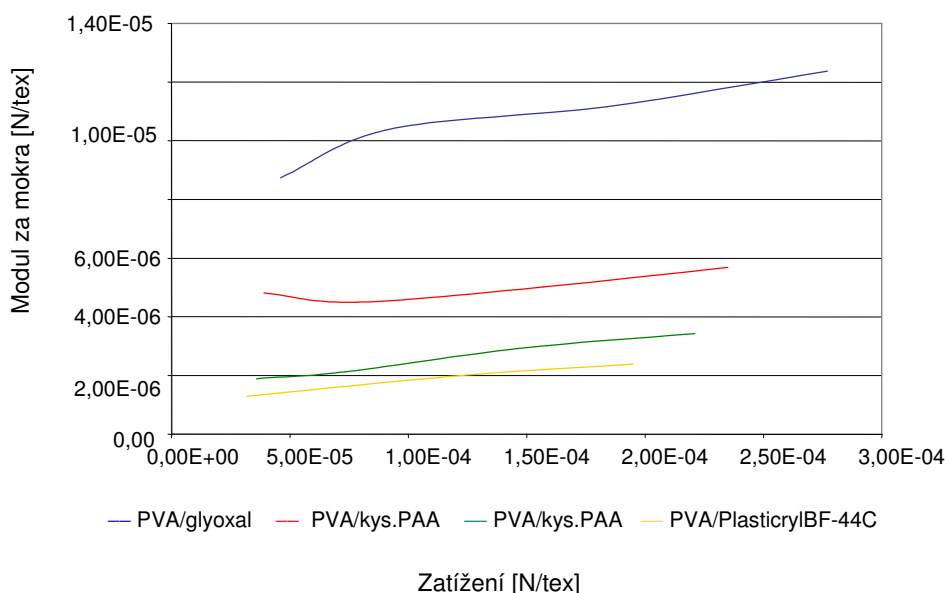
Kyselina polyakrylová – připravena laboratorně v Eastman Sokolov, molekulová hmotnost 72 840 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (měřeno SEC), obsah sušiny 32 hmot. %.

Plasticryl BF-44C – nový komerční produkt Eastmen Sokolov, kopolymer kyseliny akrylové a methakrylové, relativní molekulová hmotnost přibližně $45\,000\text{ g.mol}^{-1}$, obsah sušiny 33 hmot. %.

Pro přípravu filmů i roztoků pro electrospinning byly použity různé koncentrace kyseliny polyakrylové (PAA) ve směsi s PVA, byly testovány poměry obou komponent v hmotnostních poměrech 43/57; 67/33 a 82/18. S ohledem na následné zvláknování a snahu minimalizovat botnání vzorků byl jako optimální vyhodnocen poměr 67/33.

Z grafu (obr. 6) lze odvodit, že klesající molekulová hmotnost PAA negativně ovlivňuje mechanické vlastnosti nanovláknenných vrstev. Nižší molekulová hmotnost PAA vede k nižšímu modulu za mokra a vyššímu poměrnému prodloužení nanovláknenné vrstvy, stejně tak působí částečná neutralizace PAA.

Křivka, která odpovídá síťování glyoxalem, je jen těžko srovnatelná s ohledem na jeho koncentraci (3 hmot.%), přesto vykazuje nejnižší poměrné prodloužení a nejvyšší modul za mokra. Tento zdánlivý paradox je vysvětlitelný změnou struktury, v případě využití glyoxalu jako síťujícího činidla vzorek ve vodě více botná a vlákna se vzájemně spojují za vzniku fóliové struktury.



Obr.6 Graf závislosti smluvního modulu nanovláknenné vrstvy na zatížení pro různé druhy síťujícího činidla

6.5. Sítování PVA aldehydy

Vodorozpustné polymery s hydroxylovými skupinami jako je např. PVA lze sítovat pomocí aldehydů. Reakce mezi funkčními hydroxylovými skupinami polymeru s aldehydem za přítomnosti silné kyseliny se nazývá *acetalizace*.

Mechanické a chemické vlastnosti zesíťovaného polymeru závisí na použitém PVA, hlavně na jeho stupni hydrolýzy a molekulové hmotnosti, ale také na množství a druhu použitého aldehydu.

PVA může být acetalizován skupinami aldehydů zahrnujícími alifatické aldehydy, nenasyčené alifatické aldehydy, alifatické dialdehydy, deriváty alifatických aldehydů, aromatické aldehydy, substituované aromatické aldehydy a další.

Pro sítování PVA nanovláken byl zvolen glyoxal, a to zejména z následujících důvodů: jedná se o bifunkční aldehyd, který splňuje tudíž základní předpoklad vícefunkčnosti síťujícího činidla, díky své velké reaktivitě je hojně využíván, i když jeho biologická akceptovatelnost i ve stopové koncentraci je velmi diskutovatelná. Podle firemních materiálů BASF má glyoxal jen nízkou toxicitu prokázanou testy na zvířatech. Na rozdíl od testovaného glutaraldehydu umožňuje vytvořit relativně stabilní zvlákňovací směs pro elektrostatické zvlákňování. Stabilita směsi, která obsahuje PVA, glyoxal a kyselinu trihydrogenfosforečnou, je při vhodném skladování uspokojivá až několik týdnů. Naproti tomu glutaraldehyd vyvolává síťující reakci takřka ihned po smísení komponent, což neumožňuje následné zvlákňování.

6.5.1 Reakční mechanismus acetalizace

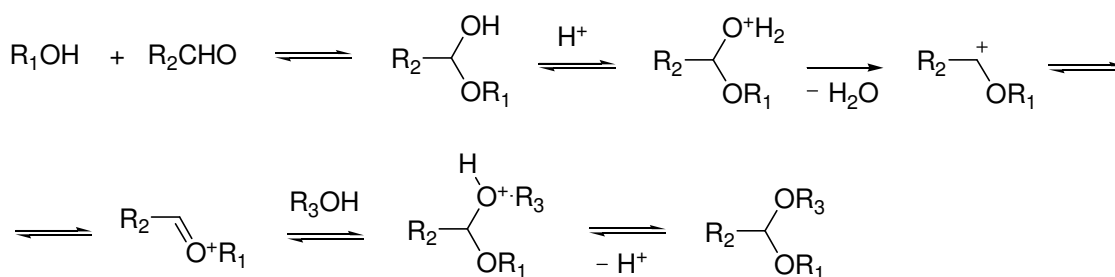
Přítomnost karbonylové skupiny v aldehydech má velký vliv na jejich vlastnosti. Aldehydy jsou s výjimkou formaldehydu kapalné látky, které mají vyšší bod varu než příslušné nasycené uhlovodíky. Příčinou je značná polarita karbonylové skupiny, takže se mohou uplatnit významné nevazebné interakce typu dipól-dipól. Ve srovnání s alkoholy je však bod varu aldehydů podstatně nižší, což je způsobeno tím, že se u aldehydu nemohou uplatňovat vodíkové vazby.

Aldehydy jsou velmi reaktivní sloučeniny. Příčinou jsou pohyblivé π -elektrony karbonylové skupiny, které jsou vlivem větší afinity kyslíkového atomu k elektronům více posunuty k tomuto atomu. Proto je dvojná vazba karbonylové skupiny $C=O$ mnohem polárnější než dvojná vazba mezi atomy uhlíku $C=C$. To je základní rozdíl v povaze adičních reakcí sloučenin, které tyto skupiny obsahují. Pro adiční reakce na karbonylovou

skupinu je typická adice nukleofilních činidel a radikálové reakce jsou vzhledem k silně polárnímu charakteru vazby C=O potlačeny na minimum. Uhlík karbonylové skupiny reaguje snadno s nukleofilními činidly, a to tím více, čím menší je hustota elektronů na tomto uhlíku. Adici lze rozložit na dva stupně. Prvý spočívá v adici nukleofilní částice na uhlík karbonylové skupiny aldehydu a jako nejpomalejší určuje rychlost celé adice. Druhý stupeň je reakce s elektrofilní částicí, nejčastěji s protonem (Červinka a kol., 1969).

Acetalizace musí být katalyzována silnou minerální kyselinou. Obecně je nejvhodnější použít kyselinu chlorovodíkovou, protože použití jiných kyselin může vést k tmavě zbarveným produktům.

Podle Červinky a kol., (1969) probíhá reakční mechanismus acetalizace nízkomolekulárních sloučenin podle schématu (obr. 7).

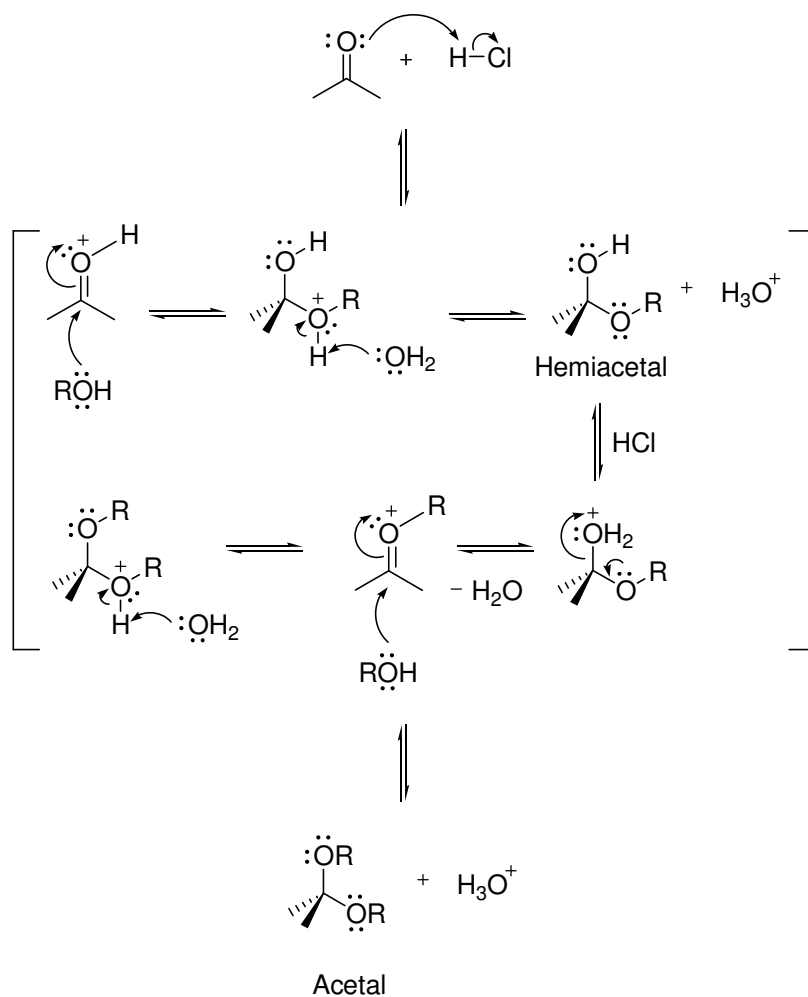


Obr. 7 Reakční mechanismus acetalizace

Aby bylo možné co možná nej přesněji interpretovat FTIR spektra získaná z nanovláknenných vrstev, bylo důležité dokonale porozumět reakčnímu mechanismu.

Nukleofilní adice alkoholu na karbonylovou skupinu zpočátku poskytuje hydroxyether označovaný jako hemiacetal. Hemiacetaly se tvoří reversibilně s favorizujícími karbonylovými sloučeninami. Avšak v přítomnosti kyseliny se může objevit další reakce. Protonace hydroxylové skupiny následovaná ztrátou vody vede ke vzniku **oxoniového iontu**, $\text{R}_2\text{C}=\text{OR}^+$, který reaguje s druhým ekvivalentem alkoholu za vzniku dimethylacetalu. Mechanismus je znázorněn na obr. 8 (Mc Murry, 1984).

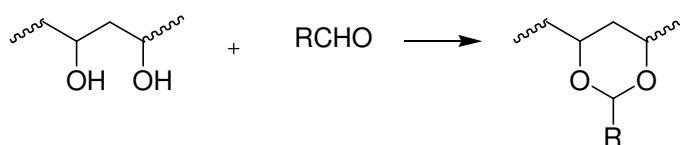
Protože všechny kroky při tvorbě acetalu jsou reversibilní, reakce může být směřována zleva doprava (od karbonylové sloučeniny k acetalu) nebo opačně (od acetalu ke karbonylové sloučenině), v závislosti na reakčních podmínkách. Reakce zleva doprava je upřednostněna za podmínek, kdy je odstraňována voda, čímž se posune rovnováha reakce.



Obr. 8 Mechanismus acetalizace

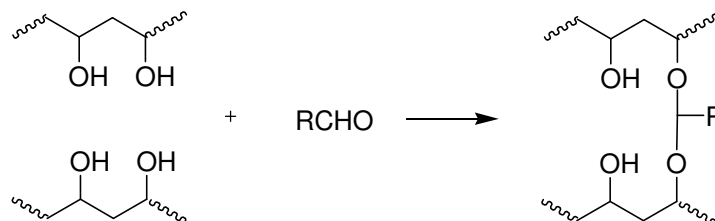
Gao a Seliskar (1998) prezentují tři druhy reakcí, kterými acetalizace PVA může probíhat:

1. Intramolekulární acetalizace 1,3 glykol skupin probíhá v rámci jednoho řetězce mezi sousedními hydroxylovými skupinami a je znázorněna na obr. 9. Ta vede ke snížení rozpustnosti, nikoliv k sít'ování.



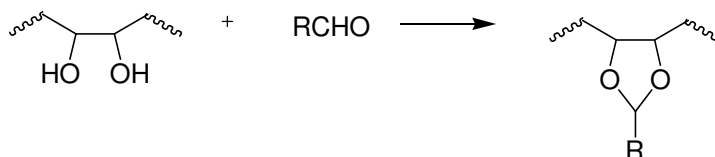
Obr. 9 Schéma intramolekulární acetalizace 1,3 glykol skupin

2. Intermolekulární acetalizace probíhá mezi dvěma různými řetězci a je znázorněna na obr. 10.



Obr. 10 Schéma intermolekulární acetalizace

3. Intramolekulární acetalizace 1,2 glykol skupin se vyskytuje velice zřídka, probíhá rámci jednoho řetězce mezi sousedními hydroxylovými skupinami a je znázorněna na obr. 11.



Obr. 11 Schéma intramolekulární acetalizace 1,2 glykol skupin

Produktem acetalizace jsou dialkylderiváty monotopických dihydroxysloučenin zvané acetaly. Acetaly se vyznačují velkou stálostí v alkalickém prostředí, avšak působení již velmi zředěných minerálních kyselin může mít za následek zánik vazby a tím zpětné uvolnění aldehydu (Martinová, Přádný, 2004).

Yao a kol.,(2003) uvádějí že, síťování aldehydy může být provedeno přidáním vybraného aldehydu a kyseliny do vodného roztoku PVA před zvlákněním nebo může být provedeno na již hotovém vlákne či filmu.

Ding a kol., (2002) diskutují metodu chemického síťování aplikovaného na shluk PVA nanovláken. Jako síťující činidlo byl použit glyoxal. Autoři došli k předpokládanému závěru, že hustotu vzniklého zesíťování ovlivňuje především koncentrace přidaného síťovadla a podmínky tepelného dosíťování.

Podrobné prostudování acetalizačních reakcí na PVA nám umožnilo připravit a optimalizovat recepturu pro síťování PVA, která je využívána při většině experimentů,

zabývajících se studiem kompozitů s nanovláknennou vrstvou např. pro zkoumání vlivu nanovláken na filtraci a na akustické vlastnosti textilních vrstev.

6.5.2. Stabilita zesíťování nanovláknenné vrstvy v závislosti na složení reakční směsi

Stabilita zesíťování nanovláknenných vrstev byla posuzována po době, po kterou byl vzorek vystaven působení destilované vody (i) při laboratorní teplotě (30 min) a (ii) za varu (10 min). Odolnost byla posuzována subjektivně, podle předem vytvořené pětibodové stupnice.

Proměnné parametry při síťování PVA ve formě vrstvy nanovláken glyoxalem s úpravou HCl byly koncentrace glyoxalu (0,5–5 hmot.%); koncentrace HCl (0,65–1,3 hmot. %); doba síťovací reakce (0–5 min); teplota (115–140 °C).

Po vyhodnocení experimentu bylo zjištěno, že se ve všech hodnocených případech projevil, bezprostředně po zvláknění, tedy bez tepelného dosíťování, určitý stupeň zesíťování PVA v nanovláknenné vrstvě. Hodnota stupně rozpustnosti a tím i míra zesíťování se však nezměnily ani po tepelném dosíťování při teplotách 115–120 °C a 145–150 °C po dobu 1–5 minut a neovlivnil ji ani obsah glyoxalu a HCl. Provedené testy ukazují, že při síťování PVA nanovláknenných vrstev účinkem glyoxalu s katalýzou HCl lze dosáhnout pouze částečného zesíťování, které potvrzuje nerozpustnost vrstev ve studené vodě, avšak rozpustnost v horké vodě.

Síťováním PVA ve formě filmů při stejných podmínkách (koncentrace, teplota, doba) bylo dosaženo výraznějšího efektu. Rozdíly v efektivnosti síťovací reakce, která probíhá v kompaktním filmu nebo v nanovláknenné vrstvě, mohou být vysvětleny těkavostí HCl a tím snížením její koncentrace v průběhu electrospinningu. Ve výsledné vrstvě nanovláken je potom obsaženo jen stopové množství HCl, které není pro katalýzu esterifikace dostatečné.

Z výsledků provedených testů vyplývá, že PVA vrstvy nanovláken síťované glyoxalem a katalyzované HCl, mají po zvláknění, tedy bez tepelného dosíťování, stejný stupeň rozpustnosti, respektive stejnou míru zesíťování jako PVA vrstvy nanovláken síťované glyoxalem za katalýzy kyselinou fosforečnou. Je tedy zřejmé, že samotný proces electrospinningu a předpokládaná tvorba poloacetalu během tohoto procesu není ovlivněna použitou kyselinou. Přítomnost kyseliny fosforečné se projeví až po aktivaci teplem. Vzhledem k nestabilitě PVA nanovláknenných vrstev připravených s použitím HCl,

nemohla být vyhodnocena vodivost výluhů při hydrolýze v závislosti na pH a teplotě, jako tomu bylo při katalýze kyselinou fosforečnou.

7. *Infračervená spektroskopie*

Infračervená spektroskopie byla využita při hodnocení průběhu chemických reakcí v nanovlákněných vrstvách jako jediná, snadno dostupná metoda.

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek. Patří mezi metody umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu.

Infračervené spektrum lze rozdělit na oblast vzdálenou $10\text{--}200\text{ cm}^{-1}$, střední (MIR) $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ a blízkou (NIR) $4000\text{--}12000\text{ cm}^{-1}$, přičemž nejpoužívanější je střední oblast.

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly.

Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance T nebo jednotkách absorbance A na vlnové délce dopadajícího záření

Transmitance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I_0) a udává se v procentech.

Absorbance je definována jako dekadický logaritmus $1/T$.

Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočet (cm^{-1}), který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí lineární.

Střední infračervená oblast je z hlediska charakterizace polymerů nejdůležitější, a to jak při kvalitativní, tak i kvantitativní analýze. Kvalitativní analýza využívá přítomnosti nebo nepřítomnosti charakteristických absorpčních pásů odpovídajících charakteristickým frekvencím jednotlivých funkčních skupin. Oblast $1600\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ je nazývána oblastí „otisku palce“ a jednotlivé pásy v ní vyjadřují skeletální vibrace molekuly. Poloha pásů v této oblasti je charakteristická pro danou funkční skupinu ($-\text{OH}$, $=\text{C}=\text{O}$, $=\text{N}-\text{H}$, $-\text{CH}_3$, aj.). Na základě rozboru IČ spektra je tedy možné určit, zda polymer obsahuje či neobsahuje určité funkční skupiny, přičemž z relativních intenzit příslušných absorpčních pásů daných skupin lze usuzovat na jejich obsah v polymeru (kvantitativní

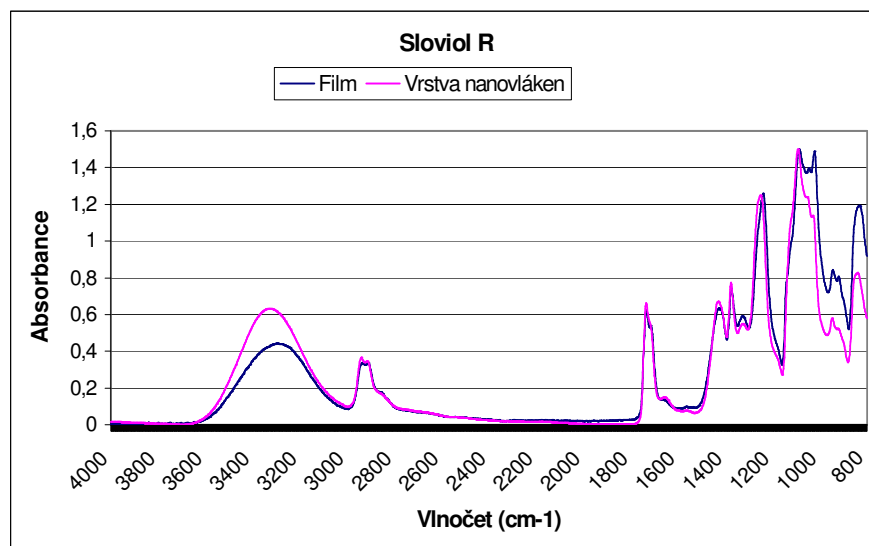
analýza). Kromě určování chemické struktury polymerů lze obecně identifikovat i nízkomolekulární látky přítomné v polymerech (monomery, zbytky rozpouštědel, změkčovadla a různá aditiva) a stanovit jejich obsah. Čisté látky lze na základě porovnání naměřených spekter se spektry ve virtuálních knihovnách spekter přímo identifikovat.

Kromě chemického složení lze rozbořením IČ spekter získat informace i o fyzikální struktuře polymerů, jako konfigurace, konformace, uspořádání a interakce polymerních řetězců (Vondráček 1988; Holzmüller a Altenburg 1966; Schneider a Doskočilová 1992).

7.1. Analýza IČ spekter PVA nanovláken

Spektra byla měřena na přístroji Spectrum One pro střední IR oblast a Spectrum One NTS pro blízkou IR oblast (fy Perkin-Elmer).

IR spektrum (obr. 12) srovnává PVA (Sloviol R – NCHZ, Slovensko) ve formě nanovláken a ve formě filmu. Tato spektra byla hodnocena pro zjištění případných rozdílů způsobených formou hmoty, jíž byl film a nanovláčenná vrstva. Nanovláčenná vrstva obsahuje chlorid sodný, přibližně v množství 0,1 M, který se podle očekávání ve spektru neprojevil.

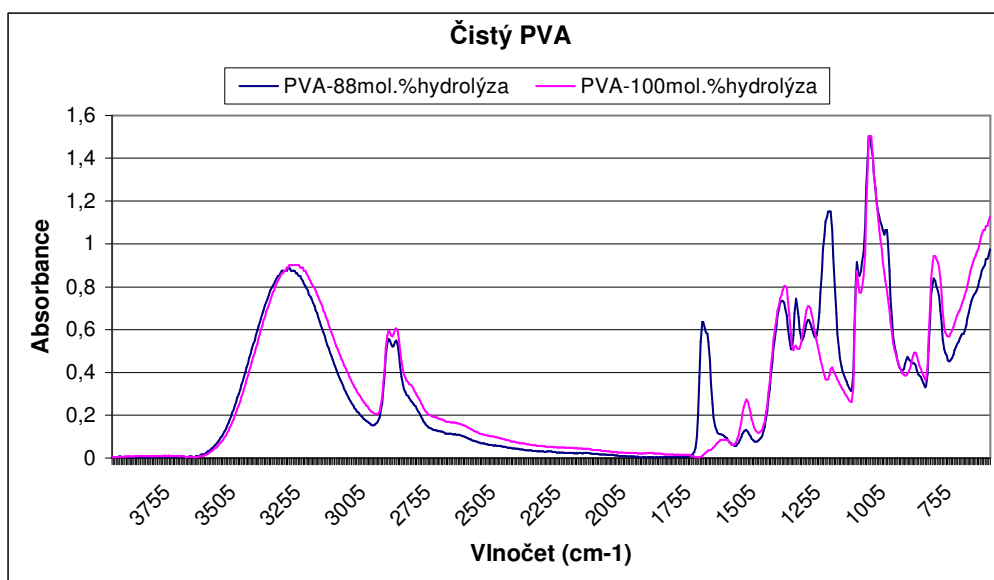


Obr. 12 IČ spektra PVA Sloviol R ve formě filmu a vrstvy nanovláken

Z porovnání spekter na obr. 12 je patrný rozdíl ve velikosti peaku v pásu okolo 3300 cm⁻¹. Tato oblast je typická pro skupinu -OH a zjištěný rozdíl může vyjadřovat různý obsah vody ve vzorcích, což se dá vysvětlit rozdílnou přípravou a odlišnou

velikostí povrchu a možností sorpce vody. Další rozdíly lze nalézt v pásu okolo 800-1000 cm^{-1} , což je oblast skeletálních vibrací molekuly, kde jednoznačná interpretace není možná vzhledem k velkému množství překrývajících se pásů, z nichž většina není charakteristická pro určitou funkční skupinu, nebo část molekuly. K přesné interpretaci by nepomohla ani separace pásů, která by v tomto případě měla velmi nejistý výsledek. Je možné, že v této oblasti se projevuje vliv formy hmoty materiálu na vlastnosti spektra.

IČ spektra PVA (obr. 12) - Sloviol R byla porovnána se spektry čistého PVA nalezenými ve virtuálních knihovnách spekter, znázorněnými na obr. 13 a byla potvrzena 99 % shoda.



Obr. 13 IČ spektra čistého PVA z virtuální knihovny spekter

Ve spektru (obr. 13) jsou porovnána spektra čistého PVA s různým stupněm hydrolyzy, získaná ve virtuální knihovně spekter. Největší rozdíl je patrný v oblasti 1720-1740 cm^{-1} , což je oblast typická pro karbonylovou skupinu. Tento rozdíl mezi plně hydrolyzovaným PVA, který v této oblasti nemá peak a dá se tedy předpokládat, že neobsahuje žádné karbonylové skupiny a částečně hydrolyzovaným PVA se stupněm hydrolyzy 88 mol. %, který v oblasti 1720–1740 cm^{-1} má výrazný peak, je dán přítomností acetátových skupin v částečně hydrolyzovaném PVA. Ze spektra (obr. 12) je patrné, že použitý PVA -Sloviol R má v oblasti 1720–1740 cm^{-1} výrazný peak, což potvrzuje, že je částečně hydrolyzovaný, jak uvádí výrobce (Novácké chemické závody).

Na obr. 14 jsou spektra pro PVA ve formě vrstvy nanovláken s obsahem 4 hmot. % kyseliny fosforečné, dosít'ované při teplotě 120–125 °C po dobu 0, 1 a 2 minuty.

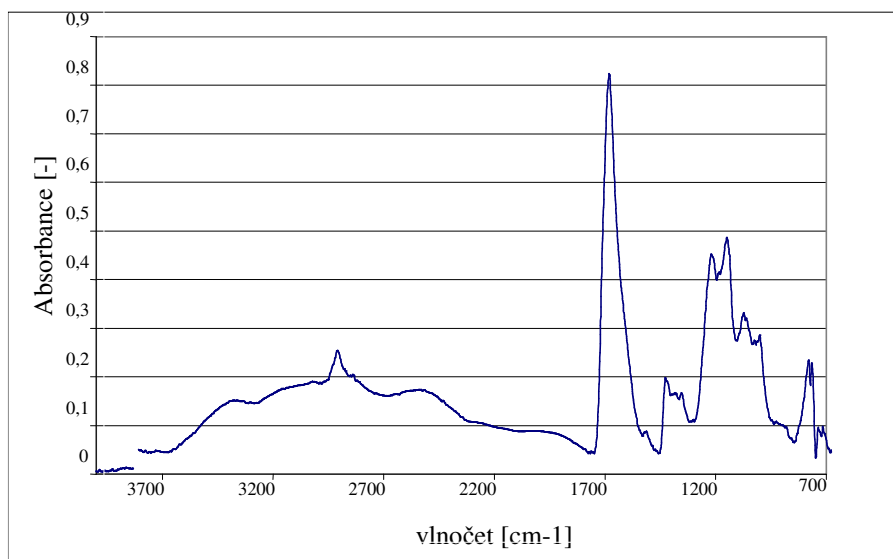
7.2. *Analýza IČ spekter zesít'ovaných nanovlákných vrstev PVA*

Jak bylo již zmíněno výše, katalýza esterifikační reakce je obvykle prováděna silnými minerálními kyselinami. Paralelně se studiem průběhu reakce v nanovlákném systému byly prováděny experimenty na filmech, připravených ze stejných polymerních roztoků, které byly využívány při electrospinningu. Takto připravené filmy sloužily k hodnocení míry zesít'ování, která byla vyjadřována hodnocením rozpustnosti, respektive sorpcí destilované vody, kterou přijaly fólie za daný čas – vyjádřeno v gramech vody vztažených na gram polymerního materiálu.

Již při těchto jednoduchých experimentech byly pozorovány zřetelné rozdíly v průběhu síťovací reakce mezi nanovláknennou vrstvou a filmem. Odhlédneme-li od rozdílné hmotnosti a specifického povrchu obou systému, bylo zjištěno, že katalýza kyselinou chlorovodíkovou ve filmu je velmi účinná, zatímco v nanovlákném systému se její účinek vůbec neprojevil. Vysvětlení lze hledat v plynném charakteru kyseliny chlorovodíkové, a jejímu vytékání z tuhnutího nanovláknna v průběhu electrospinningu.

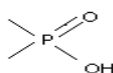
Pro další katalýzu byla využívána kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4), která kromě své katalyzační funkce a vlivu na zvýšení vodivosti elektrostaticky zvlákňovaného systému vzhledem k disociaci vytváří vazebné estery s PVA, jejichž existence byla potvrzena pomocí spekter FTIR (Martinová, Přádný, 2004).

Peak kolem 1100 cm^{-1} v FTIR spektru (obr. 14) je možné interpretovat jako vibraci $\text{P}=\text{O}$ a $\text{P}-\text{O}-\text{C}$, která je ovlivněna skeletální vibrací celé molekuly. Peak kolem 1143 cm^{-1} je charakteristický pro $\text{P}-\text{O}-\text{C}$. Proto peak objevující se kolem 1143 cm^{-1} po aktivaci H_3PO_4 dovoluje předpokládat, že nanovláknna mohou obsahovat fosfor roubovaný na uhlík v zesít'ovaných místech a fosforuhlíkatých sloučeninách.



Obr. 14 IR spektrum nanovláken PVA/PAA – esterifikační reakce katalyzovaná H_3PO_4

Kyselina trihydrogenfosforečná nemá ve vzniklých nanovlákních jen funkci katalyzátoru, což prokazují IČ spektra nanovláknenných vzorků po 24 hodinové extrakci v destilované vodě při teplotě 23 °C. Pokud by kyselina trihydrogenfosforečná nebyla chemicky navázána v nanovláknenné vrstvě, došlo by k jejímu vymytí. Charakteristické absorpční peaky – kombinace valenční vibrace O-H vazby a vodíkové vazby v seskupení

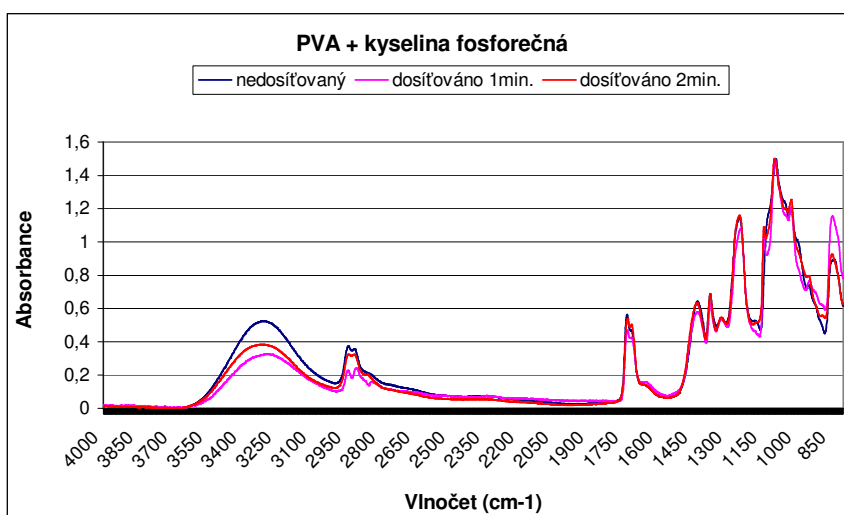


v oblasti 2550 cm^{-1} a dále zřetelné raménko u peaku příslušejícímu valenční vibraci karbonylových skupin při cca 1635 cm^{-1} ukazují na přítomnost deformační vibrace O-H vazby z výše uvedené skupiny. Tyto pásy prokazují její chemickou vazbu ve vláknech, která je však kvalitativně rozdílná v acetalizačním a esterifikačním způsobu síťování. Při acetalizačním způsobu síťování nebyla zjištěna přítomnost

skupiny $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{P}=\text{O} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$, ale pouze vazeb P-O-C a P=O okolo 1100 cm^{-1} a 1143 cm^{-1} , která v tomto spektru chybí (obr. 16).

Zeng a kol., (2004) se zabývali vlivem molekulové hmotnosti PAA a koncentrace katalyzátoru, v tomto případě kyseliny p-toluensulfonové (TOS) na stabilitu elektrostaticky připravených nanovláken z PVA a zesíťovaných esterifikační reakcí. Autoři srovnávali PAA s molekulovou hmotností M_w 1000, 100 000, 250 000 g.mol^{-1} při katalýze až s 5 hmot. % TOS a dospěli k závěru, že vysoká molekulová hmotnost použité PAA rezultuje ve vyšší stabilitu vlákna. Z námi provedených experimentů vyplývá, že pro tento vliv je určitou hranicí PAA s M_w kolem 100 000 g.mol^{-1} . Na našem pracovišti experimenty

probíhaly s PAA, M_w 70 000, 100 000 a 143 000 g.mol^{-1} (Eastman Sokolov) a PAA, M_w 100 000 a 250 000 g.mol^{-1} (BASF) a se Sokratem 72 (Eastman Sokolov), což je vodný roztok sodné soli kopolymeru kyseliny akrylové a kyseliny maleinové odebraný před neutralizací. Autory (Zeng a kol., 2004) zmiňovaná excelentní stabilita nanovláken po 24hodinové expozici vodě při laboratorní teplotě nebo páře (1 hod, 95 °C) na přiložených SEM snímcích není podle mého názoru zcela věrohodná, protože příliš velké vzdálenosti mezi vlákny zabraňují kumulaci vláken po jejich nabotnutí. Stran stability vlákenných vrstev jsou naše výsledky plně srovnatelné, morfologie vlákenné vrstvy po 24 hod expozici ve vodě při laboratorní teplotě je uspokojivá a plně závislá na koncentraci síťující komponenty.



Obr. 15 IČ spektra PVA ve formě vrstvy nanovláken s obsahem 4 hmot. % kyseliny fosforečné dosíťované při teplotě 120–125 °C po různou dobu

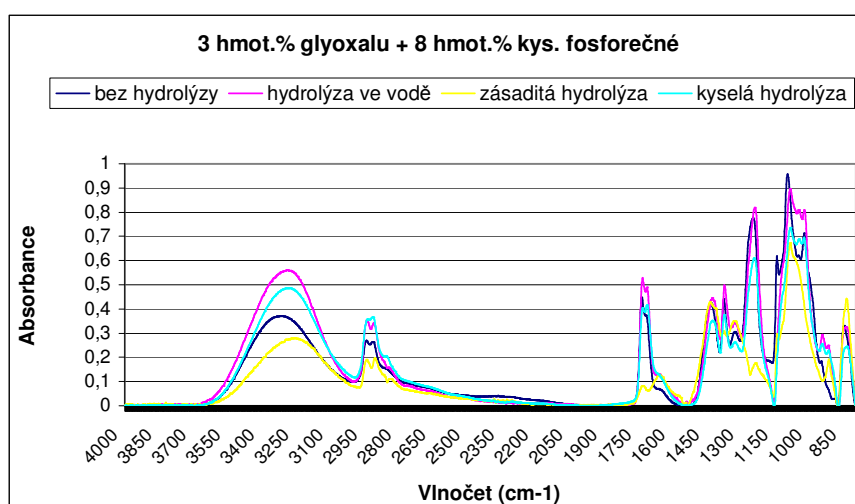
Srovnávací katalýza výše zmíněné esterifikační reakce katalyzované kyselinou fosforečnou a TOS neprokázala žádný výrazný pozitivní vliv použité TOS ani na srážlivost vlákenných vrstev při esterifikační reakci, ani na lepší stabilitu struktury vlákenné vrstvy.

Cílem stabilizace nanovlákných vrstev je nejen zajištění jejich nerozpustnosti, ale také maximální zachování vlákenné struktury. Zatímco u všech popisovaných vrstev byla dosažena nerozpustnost, testovaná ve studené i horké vodě, dokonale zachovanou strukturu vláken se nepodařilo dosáhnout ani při ekvimolárním poměru PVA a PAA.

Ve spektru (obr. 15) je patrný rozdíl mezi jednotlivými spektry nanovlákných vrstev s různou dobou dosíťování, zejména v oblasti 3300 cm^{-1} , což vyjadřuje různý obsah

vody. V pásu okolo 1150 cm^{-1} je oblast typická pro charakteristické vibrace vazby P-O, pro vzorek bez tepelného dosíťování tento peak patrný není, ale pro oba dosíťované vzorky je v této oblasti zřetelný vznik peaku, což potvrzuje přítomnost vazeb s kyselinou fosforečnou. Předpokládaný vznik esterové vazby je neprokazatelný, protože oblast charakteristických vibrací esterové vazby se nachází v oblasti skeletálních vibrací, která je velmi špatně interpretovatelná. Je ovšem možné, že v pásu okolo 1150 cm^{-1} se mohou projevovat její necharakteristické vibrace a tudíž se může podílet na vzniklém peaku.

Na obr. 16 jsou IČ spektra pro PVA ve formě vrstvy nanovláken s obsahem 3 hmot. % glyoxalu a 8 hmot. % kyseliny fosforečné dosíťované při teplotě $120\text{--}125\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dobu 3 minuty po hydrolýze při teplotě varu a při různém pH.



Obr. 16 IČ spektra PVA ve formě vrstvy nanovláken s obsahem 3 hmot. % glyoxalu a 8 hmot. % H_3PO_4 zesíťované při teplotě $120\text{--}125\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 min po hydrolýze při teplotě varu a při různém pH

Ve spektru (obr. 16) jsou výrazné rozdíly opět v oblasti okolo 3300 cm^{-1} , což ukazuje na různý obsah vlhkosti a dále je výrazný rozdíl v pásu $1720\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$, který je typický pro karbonylovou skupinu. Velice odlišný průběh od ostatních spekter má v této oblasti spektrum PVA po zásadité hydrolýze, kde peak příslušející valenční vibraci karbonylové skupiny není téměř patrný a lze tedy usuzovat, že během zásadité hydrolýzy karbonylové skupiny v zesíťovaném PVA mizí. Podobně je tomu v oblasti okolo 1150 cm^{-1} , která je typická pro charakteristické vibrace vazby P-O, ale mohou se zde projevit i necharakteristické vibrace esterové vazby. V této oblasti má zřetelný peak PVA bez hydrolýzy a PVA po hydrolýze v neutrálním prostředí, což znamená, že vytvořené vazby

s kyselinou fosforečnou jsou v neutrálním prostředí stálé. PVA po kyselé hydrolýze má peak méně zřetelný a lze tedy usuzovat na pokles obsahu vazeb s kyselinou fosforečnou během kyselé hydrolýzy. IČ spektrum PVA po hydrolýze v zásaditém prostředí peak v oblasti okolo 1150 cm^{-1} již vůbec neobsahuje a je tedy patrné, že během zásadité hydrolýzy všechny vazby s kyselinou fosforečnou jsou rozštěpeny.

8. *Superabsorpční polymery*

Superabsorpční polymery (SAPs) na bázi kyseliny polyakrylové jsou dalším elektrostaticky zvláknovaným materiálem. Při jejich síťování se opět realizuje výše popsaná esterifikace, jejíž průběhem lze regulovat vlastnosti výsledného produktu.

Superabsorpční polymery jsou schopny absorbovat kapalinu pod zátěží a v současné době jsou neodmyslitelnou součástí různých hygienických výrobků, zejména dětských plen a pomůcek pro inkontinenci dospělých. Svým účinkem umožňují výrazné ztenčení zmíněných hygienických výrobků a nižší hmotnost celulózového sorpčního jádra. Jejich komerční aplikace je známa z Japonska od 80tých let minulého století a rychle se rozšířila do celého světa. Další aplikace nacházejí uplatnění zejména zemědělství a zahradnictví při řízeném uvolňování vody (Kazanski, Dubrovskii, 1992; Clarke, 1984; Taji, 1990), při přípravě nosičů pro imobilizaci enzymů (Samsonov, Kuznetsova, 1992) nebo při ochraně podmořských kabelů proti vodě (Gourmand, Taupin, 2000).

Většina komerčně dostupných superabsorpčních materiálů je na bázi zesíťovaných polyakrylátů (Brannon-Peppas, Harland, 1990). Zesíťované polyakryláty jsou vyráběny polymerizací částečně zneutralizované kyseliny akrylové v přítomnosti různých tetra-nebo multifunkčních síťujících činidel. Množství patentů referuje o širokém rozsahu teplotních a jiných reakčních podmínek, při kterých jsou tyto materiály produkovány (Buchholz, 1990).

Superabsorpční polymery (SAPs) jsou nejčastěji aplikovány ve formě částic nepravidelného tvaru (hygienické výrobky). Když přijdou do styku s vodou nebo fyziologickým roztokem, který simuluje urinu, částice mají tendenci rychle nabotnat a pojmout okolní tekutinu. Typický superabsorpční materiál zbotná během 1 až 2 minut, ačkoliv rovnovážného zbotnání je dosaženo mnohem později.

Méně obvyklou formou superbasorbentů jsou vlákna (např. OASISTM). Hlavním důvodem pro omezené využití vláken je skutečnost, že musejí být zpracovávány ve

vlákenné směsi s jinými vlákny bez superabsorpčních vlastností, jejichž obsah je minimálně 50 hmot. %.

Problémy při aplikaci prášků s malými částicemi, které jsou preferovány pro lepší předpoklady k rychlé sorpci, jsou často způsobeny jejich nežádoucí migrací.

Nová technologie pro elektrostatické zvlákňování Nanospider, nabízející reálný potenciál pro průmyslovou výrobu, byla využita pro přípravu nanovláknenných vrstev s obsahem superabsorpčních polymerů (Martinová, Řeháková, 2006). Naše práce se týkala zvlákňování vodného roztoku kyseliny polyakrylové (PAA), částečně zneutralizované do formy sodné soli a obsahující PEG jako síťovací činidlo. Síťující reakce (esterifikace) byla následně aktivována teplem. Vlastnosti nanovláknenné vrstvy byly srovnávány s komerčními superabsorbenty ve formě prášku a vláken, zejména s ohledem na absorpční kapacitu a rychlost sorpce. Morfologie vláknenných vrstev byla sledována metodou elektronové mikroskopie. Byly vyšetřovány možnosti ovlivnění průměru vláken.

Mechanismu esterifikace byl diskutován výše. V případě síťování superabsorpčních vláken se zřetelně ukazuje, že účinnost síťující reakce, která je zde chápána jako množství zreagovaných karboxylových a hydroxylových skupin, je velmi citlivě regulovatelná podmínkami reakce, a to zejména časem a teplotou natolik, že lze variovat od vláken téměř ve vodě nebotnajících až k vláknům, které tvoří rozpustný nezesíťovaný polymer. Podmínky optimální míry zesíťování byly definovány v naší práci (Martinová, Řeháková 2006).

Nanovláknenné vrstvy připravené z výše uvedených polymerů, kde další reakční přísady jsou duševním vlastnictvím firmy Stockhausen, (Deggusa) mají plně srovnatelnou sorpční kapacitu s komerčními práškovými superabsorbenty, avšak kinetika jejich sorpce je zcela jiná, rychlost je excelentní a je možno tyto vrstvy pro sorpci vody využívat opakovaně.

Rychlost sorpce (obr. 17) nanovláknenných vrstev jednoznačně souvisí s jejich extrémně velkým specifickým povrchem. Je snadné odvodit, že pro průměr vláken 200 nm je jejich specifický povrch asi $20 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

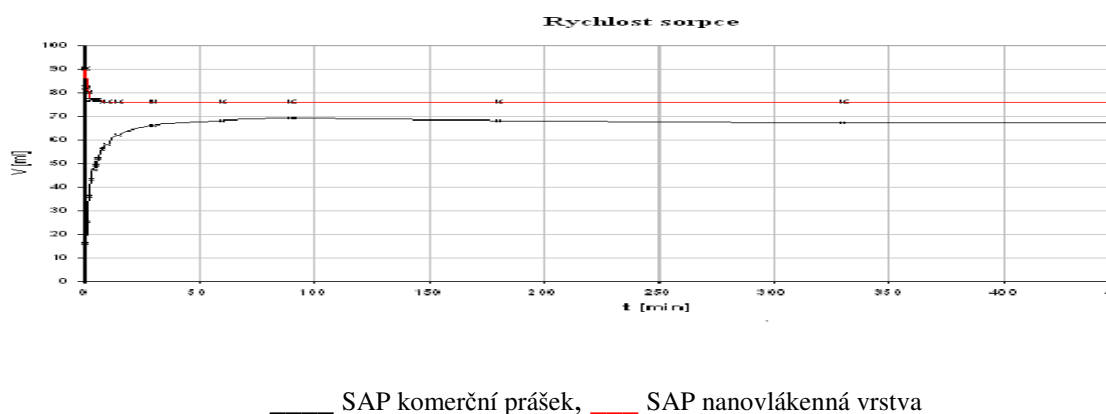
$$P_{\text{spec}} = P / M = (\pi D \cdot L) / (\pi \cdot D^2 / 4 \cdot L \cdot \rho) \quad (18)$$

kde \mathbf{P} je specifický povrch nanovláken [m^{-2}], \mathbf{M} je hmotnost [kg], \mathbf{D} je střední průměr vláken [m], \mathbf{L} je délka vláken [m] a ρ je hustota polymeru [kg.m^{-3}]. Rovnice může být zjednodušena do tvaru:

$$P_{\text{spec}} = 4 / (D \cdot \rho) \quad (19)$$

Vortex Test (Buchholz, Peppas, 1995) je metoda užívaná pro hodnocení rychlosti sorpce práškového SAP a vyjadřuje dobu, za kterou objem zbotnalého SAP dosáhne 60% hodnoty maximálního objemu, pro jehož dosažení je určeno 8 hod. Pro hodnocení rychlosti sorpce nanovláknenných vrstev toto vyjádření není ideální, protože nelze definovat čas

$t = 0$, tj. okamžik, kdy SAP prášek vhozený do válce s vodou dosáhne dna, nanovláknenné vrstvy začínají ve vodě okamžitě botnat, ale ani v silně zbotnalém stavu není jejich hmotnost dostatečná pro úplnou sedimentaci.



Obr. 17 Závislost rychlosti sorpce pro SAP nanovláknennou vrstvu a SAP komerční prášek. Pro hodnocení byl využit mírně modifikovaný Vortex Test.

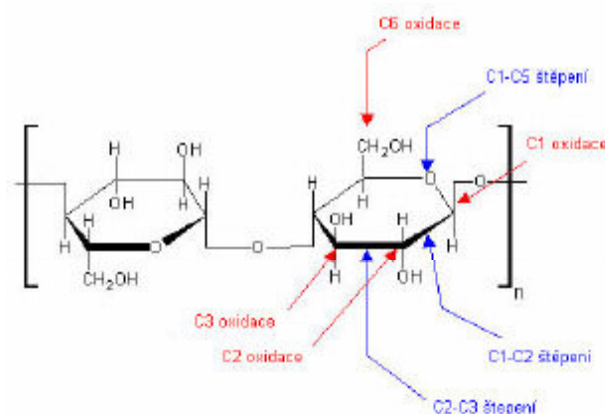
9. MDOC (Micro-Dispersed Oxidised Cellulose - *m•doc*TM)

Dalším perspektivním materiálem, jehož elektrostatické zvlákňování bylo na Katedře netkaných textilií řešeno, je MDOC – produkt patentované technologie firmy Alltracel Pharmaceuticals Plc. Nejčastěji bývá označován jako sodnovápenná sůl oxidované celulózy nebo také mikro-dispergovaná celulóza, neboli MDOC (*m•doc*TM – *Technical Specification*, 2005). Jedná se o materiál na bázi neutralizované oxidované celulózy, která se jeví jako velmi perspektivní pro celou řadu převážně chirurgických

oborů, zejména pro svou netoxicitu. Dosud nebyly prokázány žádné negativní reakce na organismus, ani kontraindikace. V mnoha experimentálních studiích (např. Bristenský a kol., 2005) se potvrdilo, že MDOC je hemostatický materiál s antibakteriálními a imunostimulačními účinky. V kontaktu s krví nebo tkáňovou tekutinou aktivuje krevní destičky, materiál zbotná, hmota podobná gelu je schopná pokrýt krvácející povrch elastickou vrstvou a vést k zástavě krvácení (hemostáza), což je důsledek přítomnosti vápenatých iontů Ca^{2+} .

Technologický proces, v jehož cíli je bio-resorbovatelná oxidovaná celulóza, je znám více než 60 let a velmi brzy vyústil v první výrobek z oxidované celulózy, tj. hemostatickou absorbovatelnou gázu, na trhu označovanou jako Oxycel, Surgicel, Traumacel, MDOC a další (Oxidized Celulose-Okcel® - produkt information).

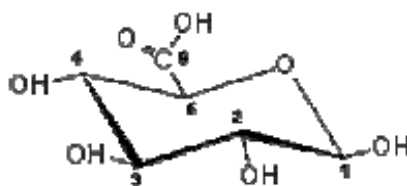
MDOC je připravovaná hydrolýzou a extrakcí oxidované celulózy (odvozené od bavlny) a vytvořením vazeb s kationty alkalických kovů, kovů alkalických zemin nebo farmaceutiky, např. antibiotiky, antivirovými prostředky a antiseptiky (ALLTRACEL, 2007). Oxidace polysacharidů je různorodá reakce, hlavním problémem je dosáhnout homogenního produktu z hlediska fyzikálně-chemických a biologických vlastností. Tato komplikace je způsobena různou reaktivitou tří hydroxylových skupin a také různou dostupností jednotlivých částí molekuly. Oxidace probíhá přednostně na šestém uhlíku základní stavební jednotky celulózy (primárně alkoholická skupina), přičemž mohou vznikat různé funkční skupiny (obr. 18).



Obr. 18 Zjednodušený vzorec sacharidu (Čerpáno z: „m•doc™ –Technical Specification“).

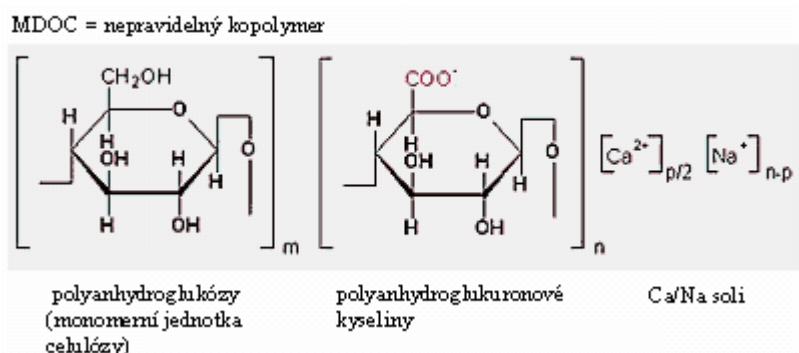
Nejčastěji se vyskytují skupiny karboxylové, nazývané také uronové, méně časté jsou skupiny aldehydové, methylolové a hydroxylové (Bristenský a kol., 2005).

Základní jednotkou oxidované celulózy je anhydroglukuronová kyselina (IUPAC Nomenclature: β -D-glycopyranuronic acid), viz obr. 19.



Obr. 19 β -D anhydroglukuronová kyselina, základní funkční jednotka oxidované celulózy. (Čerpáno z „m•docTM–Technical Specification“.

Volná karboxylová skupina oxidované celulózy je nositelem bakteriocidního účinku. Ve formě solí je vázána jenom část těchto skupin. Kyselost oxidované celulózy je snížena částečnou neutralizací na sodnovápenatou sůl, čímž vznikne MDOC.



Obr. 20 Strukturní vzorec MDOC složený z 16 - 24 hmot. % karboxylových skupin, 4 - 6 hmot. % vápníku a 1,5 – 3,5 hmot. % sodíku (vztaženo na sušinu). Čerpáno z „m•docTM–Technical Specification“

MDOC je jemně dispergovaný prášek tvořený částicemi o průměru asi 1-3 μm a jejich aglomerátů o velikosti až 10 μm , případně zbytků mikrovláken s průměrem 20–30 μm a délce maximálně 80 μm (m•docTM – Technical Specification, 2007). Materiál je charakteristický vysokou hodnotou specifického povrchu.

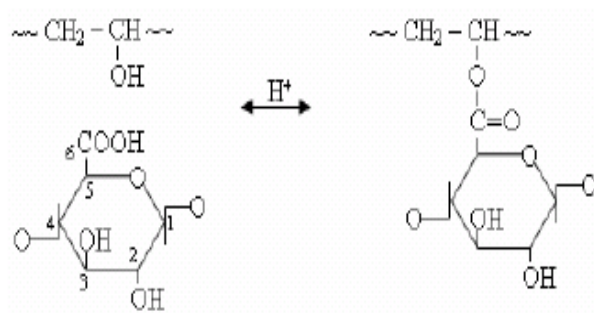
Sodnovápenatá sůl oxidované celulózy není rozpustná v běžných organických rozpouštědlech ani v zředěných kyselinách, je rozpustná v zředěných roztocích hydroxidů

a ve speciálních rozpouštědlech pro celulózu (např. Schweizerovo činidlo). Nejvhodnějším rozpouštědlem je cadoxen, což je roztok CdO ve vodném ethylendiaminu.

9.1. Možnosti síťování MDOC

Jak je uvedeno výše, struktura MDOC je tvořená jednotkami polyanhydroglukózy a polyanhydroglukuronové kyseliny, tzv. PAGA. Díky tomu MDOC obsahuje dva druhy reaktivních skupin – hydroxylové a karboxylové, které mohou být využity při vzniku kovalentních vazeb mezi vlastními řetězci nebo mezi jinými řetězci. Z biologického aspektu je zajímavá zejména tvorba s hydroxylovými skupinami vlastních řetězců nebo s hydroxylovými skupinami jiných monomerů nebo polymerů, např. PVA. Organismus je schopen esterové vazby štěpit enzymaticky i hydrolyticky, takže vzniklý zesítěný polymer je biologicky odbouratelný. Obtížnější je proveditelná esterifikace hydroxylových skupin PAGA např. kyselinou adipovou, protože dochází k značné degradaci molekul PAGA.

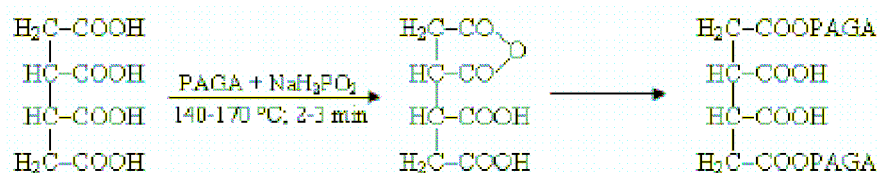
Mechanismus esterifikace je stejný, jako byl již popsán při síťování PVA. Mohou vznikat esterové vazby např. mezi $-C_{(6)}OOH$ anhydroglukuronové jednotky a $-OH$ skupinou na $C_{(3)}$ téže jednotky vlastního řetězce za tvorby laktonu $R-C_{(6)}OO-C_{(3)}-R$, nebo OH -skupinou sousedního řetězce za vzniku esterové příčné vazby. Stejně tak mohou vznikat příčné esterové vazby mezi karboxylovou skupinou jednotky PAGA a hydroxylovou skupinou jiného řetězce, např. PVA. Jako katalyzátory jsou nejčastěji využívány H_2SO_4 a H_3PO_4 .



Obr.21 Schéma esterifikace polyhydroglukuronové kyseliny (PAGA) a PVA

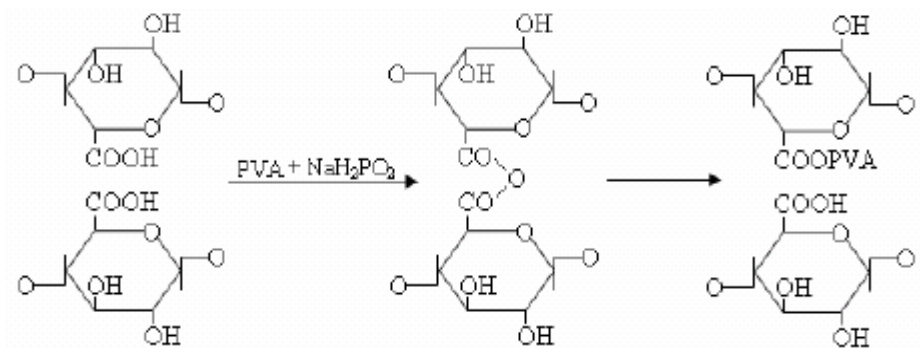
Jiný mechanismus vzniku esterové vazby vychází z polyanhydridu, který aduje $-OH$ skupinu za vzniku kyselého esteru. Přechodný útvar polyanhydridu může vznikat přímo z PAGA nebo z přidaného síťujícího činidla, např. kyseliny vinné, citrónové nebo

1,2,3,4-butanetetrakarboxylové za účasti látek se silných dehydratačních účinkem, (obr. 22), jako jsou např. koncentrované kyseliny H_2SO_4 a H_3PO_4 , ale především soli fosforové kyseliny, jako je NaH_2PO_2 .



Obr. 22 Mechanismus tvorby polyanhydridu 1,2,3,4-butanetrahydrokarboxylové kyseliny a tvorba sítě navázáním $-\text{OH}$ skupin PAGA

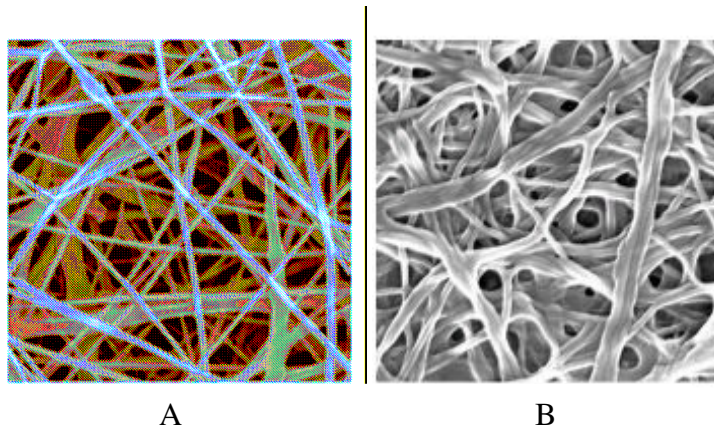
V případě, že se reakce neúčastní žádná z výše uvedených síťujících polykyselin, přichází v úvahu ještě další mechanismus tvorby sítě, a to pouze za přítomnosti fosforanu. PAGA jako polyhydroxykyselina zřejmě dokáže vytvářet polyanhydrid, který v kyselém prostředí, vhodném pro dehydrataci, zajištěném např. přítomnou H_2SO_4 a H_3PO_4 , NaH_2PO_2 , tvoří ester přednostně s $-\text{OH}$ skupinami PVA (obr. 23). Vzniklý ester je biologicky dobře akceptovatelný.



Obr. 23 Mechanismus tvorby polyanhydridu z jednotek polyanhydroglukuronové kyseliny a následná tvorba sítě s řetězcí PVA

Z dalších síťujících činidel byl testován glutaraldehyd (viz acetalizační reakce, odst. 6.5.), který byl vyhodnocen jako nevyhovující z hlediska vysoké rychlosti síťující reakce. Fosforitan sodný se také neosvědčil s ohledem na nestabilitu směsi v čase a její homogenitu. Přídavek hypofosforitanu do standardní směsi MDOC a PVA vyvolal okamžitý vznik sraženin.

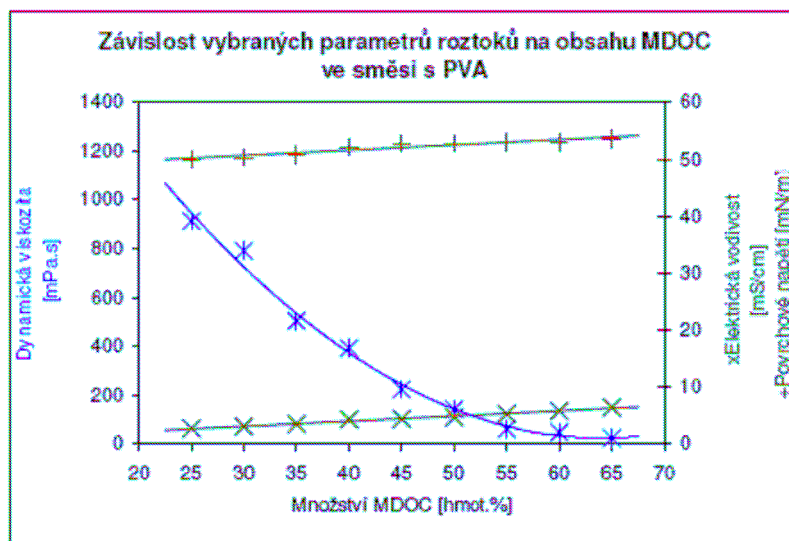
Jediným vhodným síťujícím činidlem byla shledána kyselina fosforečná, přičemž pro dosíťování je zapotřebí aktivace mikrovlnným zářením nebo horkovzdušným ohřevem. Síťování je pak stabilní. Takto tepelně dosíťovaná vrstva se po kontaktu s vodou změní v gel, který má vláknennou strukturu (obr. 24).



Obr. 24 SEM snímky nanovláknenných vrstev ze směsi MDOC/PVA (poměr 40/60) A - sucha, B - po kontaktu s vodou a následném vysušení

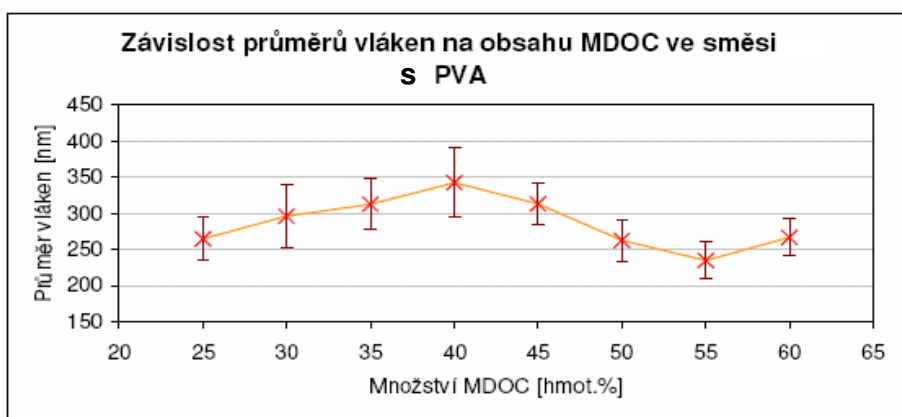
9.2. Elektrostatické zvlákňování MDOC a PVA

Biskupičová (2006) popisuje přípravu nanovláknenné vrstvy ze směsi 16 hmot. % MDOC a 16 hmot. % PVA a zjišťuje, že množství MDOC ve směsi výrazně ovlivňuje elektrickou vodivost roztoku a méně i povrchové napětí. (obr. 25).



Obr. 25 Graf závislosti dynamické viskozity, elektrické vodivosti a povrchového napětí má množství 16 hmot. % MDOC ve směsi s 16 hmot. % PVA (Převzato z: Biskupičová, 2006)

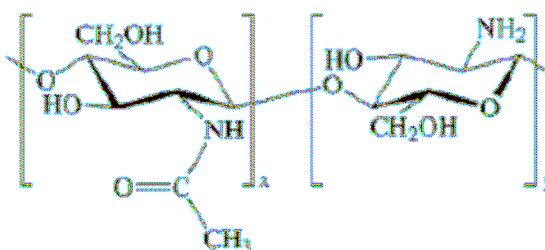
Z průběhu grafu na obr. 25 je patrné, že viskozita polymerního roztoku s rostoucím množstvím MDOC klesala nelineárně, zatímco elektrická vodivost i povrchové napětí mírně stoupaly. Byla zde potvrzena očekávaná závislost geometrických charakteristik vrstev a výrobnosti Nanospideru na množství MDOC ve směsi. Výkon zvlákňování klesal s rostoucím množstvím MDOC ve směsi, zatímco průměry vláken zůstaly neovlivněny (obr. 26).



Obr. 26 Graf závislosti průměru vláken na obsahu MDOC ve směsi s PVA
(Převzato z: Biskupičová, 2006)

10. Chitosan

Chitosan je biosyntetický polysacharid, který je získávaný deacetylací chitinu. Chitin je přírodní polysacharid, který může být extrahován ze schránek korýšů nebo generován fermentačním procesem. Chitosan je β -1,4 lineární polymer 2-amino-2-deoxy-d-glukopyranosy, která nese v roztocích kyselin pozitivní náboj díky protonizované amino skupině (Kaplan a kol., 1994).



Obr. 27 Strukturní jednotka chitosanu

Existuje hypotéza, že majoritní cesta pro přeměnu chitinu na chitosan in vivo probíhá účinkem lysozymu, který působí pomalou depolymerizaci polysacharidů (Karavel a Domard, 1993). Stejně jako kyselina hyaluronová chitosan není antigenní a je při

implantaci dobře tolerovaným materiálem. Díky svému pozitivnímu náboji při fyziologickém pH, chitosan je též bioadhezivem, které zvyšuje retenci na straně aplikace (He a kol., 1998; Calvo a kol., 1997). Chitosan podporuje léčbu zranění (Biagini a kol., (1992;)) a má bakteriostatický efekt (Felt a kol., 2000; Liu a kol., 2001). Různé aplikace chitosanu, zahrnující využití v tkáňových krytech, kontrolovaném transportu léčiv a v bioadhezivních materiálech byly již popsány, ale teprve nedávno bylo zjištěno, že chitosan díky pozitivnímu náboji může mít vliv na pevnost spojení mezi buňkami. Bylo prokázáno, jak velmi efektivně může být ovlivněn transport léčiv, zejména takových, které vykazují polární charakter. Detailní popis medicínálních aplikací chitosanu uvádí např. Hon (1996).

Nezanedbatelnou skutečností zůstává, že chitosan se vyskytuje relativně hojně, jeho produkce je nízkonákladová a ekologicky příznivá. V medicíně a farmaceutických aplikacích je chitosan užíván také jako součást hydrogelů.

Biodegradační rychlost tohoto polymeru je určena množstvím zbytkových acetylových skupin, tedy stupněm deacetylace, parametrem, který může být snadno měněn. Chemickou modifikací lze získat materiál s různými fyzikálními a mechanickými vlastnostmi (Muzzareli a kol., 1988; Wang a kol., 1988; Laleg a Pikulík, 1991). Například, chitosanový film nebo vlákna mohou být účinkem vhodných síťujících činidel zesíťována. Chitosanový hydrogel může být získán různými mechanismy fyzikálního nebo chemického síťování (Roberts a Tailor, 1989; Mi a kol., 2000), iontového síťování (Draget, 1992) nebo síťování pomocí vodíkových můstků (Vachoud a kol., 1997; Moore a Robers, 1980).

Chitosan je zpracováván do membrán a maticí vhodných zejména pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Zpracování chitosanových matic je umožněno zejména díky využití vnitřních elektrostatických vlastností molekuly. Polymerní řetězce chitosanu jsou vzájemně poutány elektrostatickými interakčními silami mezi aminovými skupinami. S rostoucími iontovými silami se snižuje vzdálenost mezi řetězci, což ve svém důsledku zvyšuje počet vazných bodů mezi nimi a tím i tuhost matrice.

Rigidní D-glukozoaminová struktura, vysoká krystalinita a četnost vodíkových mezimolekulárních vazeb vede k nízké rozpustnosti v běžných organických rozpouštědlech a omezuje zpracování chitosanu. Nižší molekulová hmotnost, nižší krystalinita při nepravidelné acetalizaci všeobecně zvyšují rozpustnost v roztocích kyselin, a tím umožňují zpracování chitosanu do různých forem a také vláken (Ohkawa a kol., 2004; Bhattarai a kol., 2005; Subramanian, 2005). Chitosanová molekula je neutrální, ale vytváří intermolekulární vodíkové vazby, které ztěžují rozpustnost. Díky amino skupině na řetězci je

chitosan dobře rozpustný ve vodných roztocích kyselin a po protonizaci aminové skupiny vykazuje vlastnosti kationaktivního polyelektrolytu.

10.1. Chování polyelektrolytu v nepřítomnosti soli a vliv soli na elektrostatické zvlákňování

Je dobře známo, že neionizované ohebné lineární makromolekuly zaujímají v roztoku tvar klubka, jehož rozměry jsou určeny jednak délkou řetězce, jednak závisí na interakcích krátkého a dlouhého dosahu. U lineárních polyelektrolytů k tomu přistupuje velmi výrazný vliv elektrostatických interakcí, jichž se zúčastňují náboje ionizovaných skupin řetězce a náboje malých iontů přítomných v doméně a v okolí makroiontu. Ve vodě disociuje určitý podíl ionizovatelných skupin, které se stanou nositeli elektrického náboje. Není-li polyelektrolyt amfoterní, mají všechny náboje stejné znaménko a navzájem se odpuzují. Malé ionty, tj. protionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí, vytvářejí v elektrickém poli nabitého řetězce iontovou atmosféru, která zeslabuje odpudivý účinek a tím vyvolává výrazné změny konformací makroiontu, což se nápadně projeví i na fyzikálních vlastnostech roztoku. Popisem změny viskozity při interakci chitosanu a PEO po přidavku soli se zabývali např. Juany a Han (1999) a odvodili na základě platnosti Hugginsovy viskozitní rovnice nový vztah, vyjadřující chování binární makromolekulární směsi (chitosan a PEO) v přítomnosti přidané soli. Podle Debyeovy-Hückelovy teorie nízkomolekulárních elektrolytů by se dalo očekávat, že mírou odstiňující účinnosti přidané soli bude iontová síla I , která závisí na čtverci mocenství obou iontů soli. Experiment však ukazuje, že rozhodující vliv má valence iontu nesoucího náboj opačný k náboji makroiontu (Pouchlý, 2001). Navzdory této skutečnosti je nadále používán při zvlákňování chitosanových polymerních směsí chlorid sodný s ohledem na biomedicínální aplikace.

10.2. Elektrostatické zvlákňování roztoků chitosanu

Přestože existuje množství prací např. (Genk a kol., 2005; Okhawa a kol., 2004; Min a kol., 2004; Bhattarai, 2005), popisujících elektrostatické zvlákňování chitosanových roztoků z různých rozpouštědel a s různým stupněm deacetylace, dříve zmíněnou metodou Nanospider se doposud nepodařilo zvláknit čistý roztok chitosanu, navzdory desítkám experimentů s různými typy kyselin jako je octová, mravenčí, chlorovodíková, jantarová, mléčná, a to v nejrůznějších koncentracích pokrývajících prakticky celé koncentrační spektrum. Stejně tak bylo neúspěšně odzkoušeno kontroverzní rozpouštědlo 1,1,1 3,3,3-hexafluoro-2-propanol.

Z provedených experimentů vyplývá, že chitosanová nanovlákná nemohou být elektrostaticky zvláknována z vodných roztoků kyselin metodou Nanospider, pro příliš vysokou viskozitu a vysoké povrchové napětí ($51\text{--}55 \text{ mN.m}^{-1}$), které se ustavují v roztocích s dostatečně velkým množstvím polymeru nezbytným pro electrospinning. Roztoky s vhodnou viskozitou, ale tím i nižší koncentrací polymeru umožňují, aby v elektrostatickém poli probíhalo pouze rozprašování (electrospraying), což bezprostředně souvisí s hodnotou Simha-Frisch parametru $= c.[\eta]$, často uváděného také jako Berryho číslo, které vyjadřuje stupeň zapletení polymerního řetězce (Frisch a kol., 1956). Veličinou c je rozuměna koncentrace polymerního roztoku a $[\eta]$ je hodnota limitního viskozitního čísla, které je určeno podle Mark-Howingovy rovnice (Vollmert, 1962). Z hodnoty Berryho čísla lze poměrně přesně predikovat, zdali polymerní roztok bude při elektrostatickém zvláknování vytvářet kapky, vlákna, případně směs kapek a vláken. (Shenoy a kol., 2005; Gupta a kol., 2005; Martinová a kol., 2005).

Zvláknování binárních směsí roztoků polymerů, např. PVA/chitosan (Růžičková a kol., 2005) nebo chitosan/PEO lze považovat za úspěšné a takto připravené vrstvy jsou nyní předmětem biomedicínálních zkoušek. Metodou Nanospider se dosud podařilo připravit nanovláknennou vrstvu s obsahem max 40 % chitosanu ze směsi PVA/chitosan. Zvláknování směsí polymerních roztoků chitosan/PEO umožňuje významně zvýšit podíl chitosanu až na 89 hmot. % v sušině.

Roztok chitosanu intenzivně odolává zvláknění metodou Nanospider. Jako protonizovaný kationtový polyelektrolyt má značně rozbalený řetězec a vytváří mezimolekulární aglomeráty díky vzájemným interakcím mezi hydroxylovými a aminovými skupinami. Obecně platí, že chitosan v roztoku je polyelektrolyt nesoucí pozitivní náboj, jestliže se zvýší iontové síly vlivem polarizace elektrickým polem, elektrická dvojvrstva je stlačena (Wu, 1993), což má za následek snížení odpuzivých sil skupin $-\text{NH}_3^+$ v chitosanovém řetězci, a agregační chování chitosanu se mírně posílí. Elektretové projevy chitosanu v průběhu polarizace také omezují vzájemné odpuzování skupin $-\text{NH}_3^+$.

Chitosan je označován jako bioelektret. Toto slovo je kombinací „electricity“ a L“magnet“, a bylo navrženo Oliverem Heavisidem již v roce 1885. Za electret je obecně považován materiál, který má quasi-permanentní elektrický náboj nebo polarizaci. Electret, který generuje vnitřní nebo vnější elektrické pole, je elektrostatickým ekvivalentem permanentního magnetu. Electretové materiály jsou poměrně obvyklé v přírodě (křemen

a jiné formy oxidu křemičitého), v současnosti je známo i mnoho electretů na bázi syntetických polymerů.

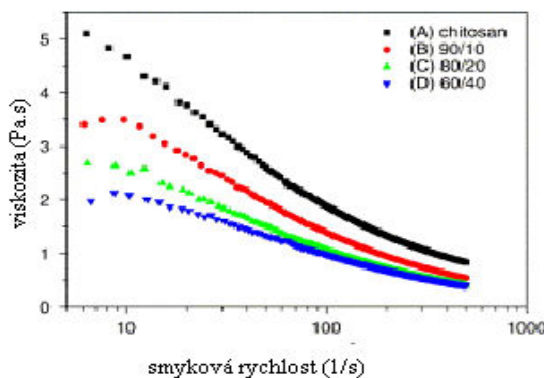
Wang a kol., (1997) studovali tvorbu aglomerátů bioelectretu chitosanu ve vodných roztocích užitím fluorescenční spektroskopie a potvrdili, že chitosan vykazuje ve vodném roztoku zřetelný sklon k samosdružování vlivem intermolekulárních interakcí. Polarizace roztoku při electrospinning tyto projevy výrazně zesiluje.

Makromolekuly uspořádané do polymerní fyzikální sítě nemohou být účinkem elektrostatického pole, jehož maximální hodnota na dostupném zdroji je 70 kV, vytahovány z roztoku k protielektrodě. Přídavek vodného roztoku PEO nebo PVA vede ke vzniku polyelektrolytového komplexu (PEK) nebo agregátu, jehož konformaci významně ovlivňuje obsah NaCl. Přímým důkazem může být nezvláknitelnost binární směsi chitosan/PEO bez obsahu NaCl. Změnu vodivosti roztoku po přidavku roztoku NaCl lze v tomto případě považovat za efekt druhotný, prvořadá je změna konformace molekul polyelektrolytu v přítomnosti solí. V souladu se známými skutečnostmi stran chování polyelektrolytu v přítomnosti solí lze předpovědět, že přidaná sůl významně ovlivní interakci chitosanových a PEO makromolekul. Efekt se bude zmenšovat s rostoucí koncentrací přidané soli. Tato závislost byla potvrzena pro různé molekulové hmotnosti chitosanu a může být interpretována pomocí následujícího mechanismu: při nízké koncentraci soli jsou chitosanové řetězce natažené a rozvolňované působením odpudivých elektrostatických sil, a proto se flexibilní PEO řetězec se může snadněji připojit vodíkovými vazbami k chitosanovému řetězci a vytvořit chitosan-PEO komplex. Pravděpodobně se utvářejí dva druhy vodíkových vazeb, první se ustavuje mezi hydroxylovými skupinami chitosanu a ethericky vázaným kyslíkem PEO, druhý typ vazby vzniká mezi kyselým vodíkem kvartérní amoniové skupiny a ethericky vázaným kyslíkem PEO. S rostoucí koncentrací soli se efektivní náboj chitosanového řetězce zmenšuje, řetězec se sbaluje, což způsobuje redukci sekundárních vodíkových vazeb zmíněných výše a interakce chitosanu s PEO se zeslabuje.

PEK vykazuje vyšší citlivost ke změnám pH ve srovnání s kovalentně síťovanými chitosanovými hydrogely. Chitosan/PVA komplexy reprezentují zajímavou alternativu pro přípravu biokompatibilních systémů pro transport léčiv, jestliže není zahrnuta kontrola pH.

Pokles viskozity může být v polymerní binární směsi dosažen změnou intermolekulárních a intramolekulárních interakcí mezi řetězci chitosanu a PEO. Molekuly PEO se navazují na řetězce chitosanu, vytvářejí nové vodíkové můstky mezi -OH skupinami

chitosanu a molekulami vody v roztoku, a tím rozrušují původní vodíkové můstky mezi řetězci chitosanu, což se projeví zvýšením rozpustnosti chitosanu a poklesem viskozity roztoku. Z předešlého tedy vyplývá, že PEO je vhodný polymer pro tvorbu binární směsi s chitosanem při elektrostatickém zvlákňování. Čím více PEO je ve směsi chitosan/PEO obsaženo, tím je viskozita výsledného roztoku menší (obr. 28), a tím snadněji probíhá electrospinning.



Obr. 28 Závislost viskozity polymerní směsi chitosan/PEO na obsahu PEO (převzato z: Bhattarai a kol., 2005)

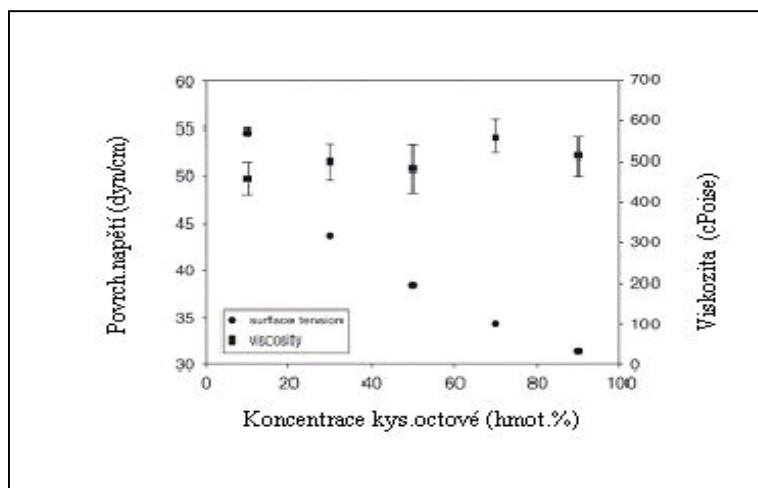
Pokles viskozity polymerního roztoku chitosanu může být vyvolán i jinými prostředky. Ilina a Varlamov (2004) informují o poklesu viskozity chitosanového roztoku v důsledku hydrolytické degradace glykosidických vazeb vyvolané kyselinou mléčnou (LA), jejíž roztok (1 hmot. % ~ 0,1 M, pH 3,7) může být jedním z rozpouštědel chitosanu při praktických aplikacích. Roztok s vyšší koncentrací by mohl vyvolat částečnou deacetylaci při prolongované hydrolyze a zjištěný pokles viskozity by byl nejednoznačný. V tomto případě však IČ spektra neprokázala žádnou změnu v oblasti 1663 cm^{-1} (amidy I), ani v oblasti 1579 cm^{-1} (amidy II), a to ani po 180 dnech. Bylo zjištěno, že hydrolyza chitosanu probíhá snadněji, má-li vyšší molekulovou hmotnost než $1300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a vyšší stupeň acetylace.

10.3. Vliv povrchového napětí chitosanového roztoku na průběh electrospinningu

Povrchové napětí je jedna z rozhodujících veličin při vzniku Taylorových kuželů účinkem elektrostatických sil na povrchu polymerního roztoku. Jsou jím vymezeny hranice pro zvláknitelnost polymerního roztoku, jestliže ostatní proměnné zůstávají konstantní. Nižší povrchové napětí napomáhá electrospinningu a umožňuje pracovat s nižšími hodnotami elektrického pole. Geng a kol., (2005) prokázali, že rostoucí koncentrace kyse-

liny octové v roztoku chitosanu způsobuje snížení povrchového napětí. Viskozita roztoků se s rostoucí koncentrací kyseliny neměnila, povrchové napětí při změně koncentrace kyseliny octové v intervalu 10–90 hmot. % pokleslo z 56,6 na 31,5 mN.m⁻¹ (obr. 29). Vyšší koncentrace kyseliny octové v roztoku chitosanu též zvyšuje hustotu povrchového náboje roztoku umístěného do elektrického pole. Je známo, že přídavek rozpustné soli také zvyšuje hustotu náboje na povrchu roztoku, což umožní intenzivnější projevy nestability (wipping instability) při formování vlákna (Hohman a kol., 2001). Zcela stejný efekt přidané soli na zjemnění vláken byl pozorován při zvlákňování polyEOEMA a kopolymeru HEMA/EOEMA.

Je pravděpodobné, že geometrie jehlového spinneru, na kterém Genk a kol., (2005) prováděli své experimenty, napomáhá formování Taylorových kuželů, ale při technologii Nanospider, kdy se Taylorův kužel formuje účinkem elektrického pole na zaobleném povrchu rotujícího válečku, se ani maximální koncentrace kyseliny octové neprojevovala pozitivně.



Obr. 29 Závislost povrchového napětí v roztocích chitosanu na koncentraci kyseliny octové, (převzato z: Geng a kol., 2005)

10.4. Vliv molekulové hmotnosti chitosanu a stupně deacetylce na electrospinning

Stupeň deacetylce (degree of deacetylation -DDA) udává podíl acetylované a deacetylované formy chitosanu. Tento faktor je velmi důležitý, především z hlediska rozpustnosti a viskozity získaného roztoku a tím i vlivu na electrospinning. Existuje několik metod pro stanovení DDA, mezi nejpoužívanější lze zahrnout infračervenou

spektroskopii (IR), magnetickou rezonanci (NMR) a spektroskopii v ultrafialové oblasti (UV). Kromě spektrálních metod se také používají např. potenciometrie, bromovodíková titrace a reakce aminoskupiny s ninhydrinem. Dodavatel, případně výrobce chitosanu, vždy deklaruje interval stupně deacetylce, a to obvykle mezi 70–85 %. Stanovení stupně deacetylce třech různých typů chitosanu (firma Wako, Aldrich – chitosan se střední a vysokou molekulovou hmotností, Fluka) metodou IR, provedené na TUL, odhalily rozdíly ve stupni deacetylce max. 5 %, čímž nebylo možné vysvětlit výrazně odlišné chování vzorků chitosanu z pohledu viskozity roztoku a schopnosti elektrostatického zvlákňování. Rozdílné chování roztoku chitosanů při elektrostatickém zvlákňování je potom možné vysvětlit jen rozdílnou molekulovou hmotností. Žádný z dodavatelů chitosanu (Fluka, Aldrich, Wako) neuvádí molekulovou hmotnost chitosanu, ale pouze interval pro viskozitu 1% roztoku v 1% kyselině octové, jehož šíře bývá značná, např. firma Aldrich udává viskozitu (Viscosity Brookfield) v intervalu 200–800 cP, což odpovídá přibližně molekulové hmotnosti 100 000–300 000 g.mol⁻¹. Experimenty prokázaly, že tento interval molekulové hmotnosti s ohledem na tvorbu chitosanových komplexů je nevyhovující a je třeba pracovat s chitosanem, jehož molekulová hmotnost je na spodní hranici uvedeného intervalu, nebo mírně pod ní. Molekulová hmotnost je důležitým parametrem chitosanu využívaného pro elektrostatické zvlákňování. Průměrná molekulová hmotnost chitinu se pohybuje v rozmezí od 1,03.10⁶ do 2,5.10⁶ g.mol⁻¹, zatímco u chitosanu se tato hodnota pohybuje od 1.10⁵ do 5.10⁵ g.mol⁻¹.

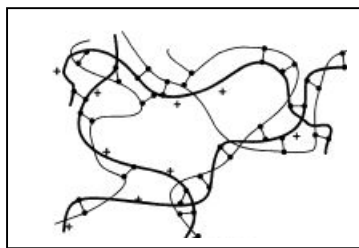
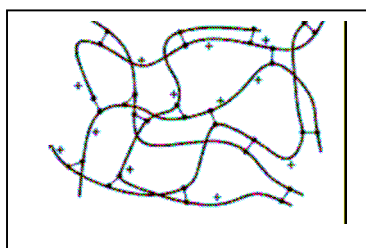
Snižování koncentrace chitosanového roztoku pro electrospinning pod 3 hmot. % pro zajištění optimální viskozity je kontraproduktivní, neboť při poklesu koncentrace roztoku pod optimální hodnotu, která je pro každý polymer jiná, roztok neobsahuje dostatečné množství polymeru (chitosanu) potřebného pro vznik stabilních, pevných vláken a elektrostatické zvlákňování se mění v elektrostatické rozprašování (spraying). Tato skutečnost odpovídá nízké hodnotě Berryho čísla (Shenoy a kol., 2005).

10.5. Chitosanové hydrogely

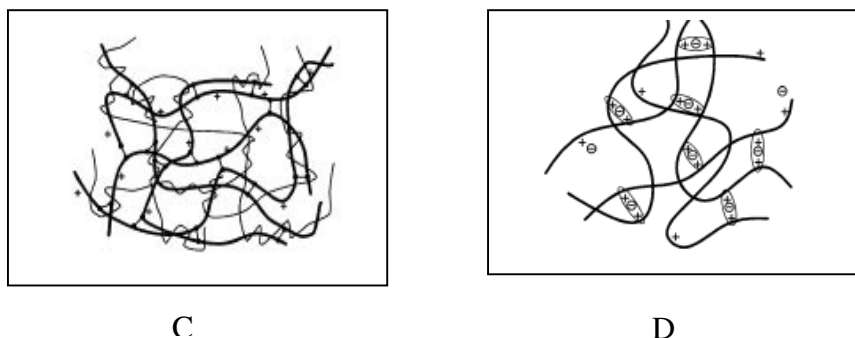
Peppas (1986) definuje hydrogel jako makromolekulární trojrozměrnou síť (3D), která botná ve vodě nebo biologických tekutinách. Hydrogely jsou často rozdělovány do tří skupin v závislosti na povaze vazeb v polymerní síti : (i) zapletené sítě, (ii) kovalentně zesíťované, (iii) sítě vytvořené sekundárními vazbami. V popisu chitosanových hydrogelů není toto rozdělení zcela vhodné, protože hranice mezi jednotlivými kategoriemi není

ostrá. Lépe vyhovuje klasifikace rozdělující hydrogely na chemické a fyzikální; chemické hydrogely jsou tvořeny ireversibilními kovalentními vazbami mezi řetězci, fyzikální hydrogely jsou vytvořeny díky různým reversibilním vazbám - může se jednat o iontové interakce, jako tomu je v iontově zesíťovaných hydrogelech a polyelektrolytových komplexech nebo o sekundární interakce, jako tomu je v komplexech chitosan/PVA. Kovalentní zesíťování vede ke vzniku permanentních sítí, které umožňují volnou difúzi vody a zlepšují mechanické vlastnosti gelu. Tyto gely mají dvě hlavní aplikace – pro systémy dávkování léčiv a konstrukci scaffoldů pro buněčné kultury.

Hydrogely založené na kovalentně zesíťovaném chitosanu mohou být rozděleny podle struktury do tří kategorií: chitosan zesíťovaný sám se sebou (obr. 30-A), hybridní polymerní síť (hybrid polymer network – HPN), (obr. 30-B) a částečně nebo plně interpenetrující síť (interpenetrating polymer network – IPN), (obr. 30-C). Nejjednodušší strukturu charakterizuje zesíťování zrealizované dvěma strukturními jednotkami, které mohou, ale nemusí, příslušet jednomu řetězci (Monterio, 1999). Hydrogely na bázi HPN jsou tvořeny vazbami mezi strukturními jednotkami chitosanového řetězce a strukturními jednotkami řetězce jiného typu, přičemž reagující jednotky mohou také patřit jednomu druhu polymeru. Částečně nebo úplně IPN obsahují nezreagovaný polymer přidaný k chitosanu před síťováním, což vede k vytvoření zesíťovaného chitosanu, ve kterém je nezreagovaný polymer zachycený - (částečně IPN). Ovšem, následné síťování je též možné - (plně IPN). Silné intermolekulární vazby (HPN) s chitosanem vytváří např. želatina (Yin a kol., 2000) a částečné IPN tvoří i chitosan např. s polyethery (Yao a kol., 1993 ; Guan a kol., 1996) nebo PEO (Khalid a kol., 1999).



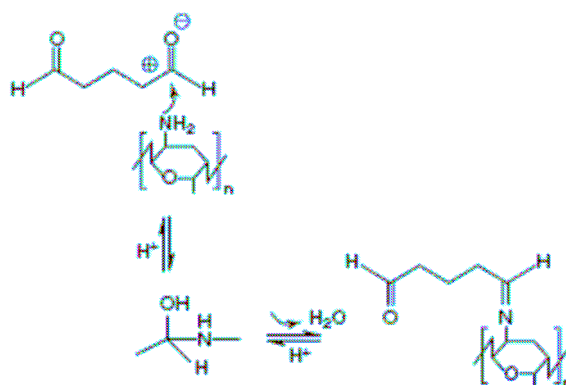
A- chitosan zesíťovaný sám se sebou, B – hybridní polymerní síť



C- částečně penetrující síť, D- iontové zesíťování chitosanu

Obr. 30 Struktura chitosanového hydrogelu vytvořená: A - chitosan zesíťovaný sám se sebou, B- hybridní polymerní síť, C- částečně penetrující síť, D – iontové zesíťování ; •—• kovalentní zesíťování, + kladný náboj chitosanu, — chitosan, ——— přídavný polymer, ⊖ náboj iontového síťovače, ⊕ iontová interakce.

V současné době jsou nejrozšířenějšími sítujícími činidly pro chitosan dialdehydy, jako je glyoxal (Khalid a kol., 1999) a částečně i glutaraldehyd (Aly, 1998). Jejich reakce s chitosanem je dobře zdokumentovaná. Aldehydické skupiny vytváří kovalentní iminové vazby s aminovými skupinami chitosanu (Schiffova reakce), obr. 31.



Obr. 31 Vytváření Schiffovy báze(C= N) mezi aminovou skupinou chitosanu a aldehydickou skupinou glutaraldehydu

Reakce dialdehydu s hydroxylovými skupinami chitosanu nemohou být též vyloučeny (Dumitriu, 1999). Tyto acetalizační reakce však probíhají již za mírných podmínek v kapalném prostředí, a tudíž nejsou vhodné pro svou viskózní nestabilitu jako

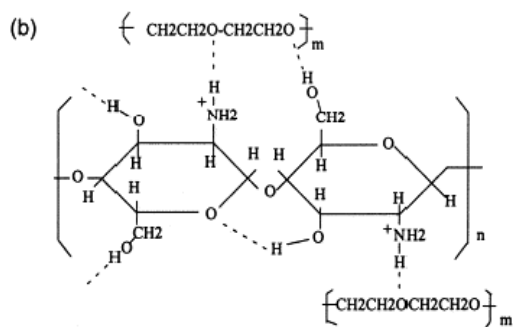
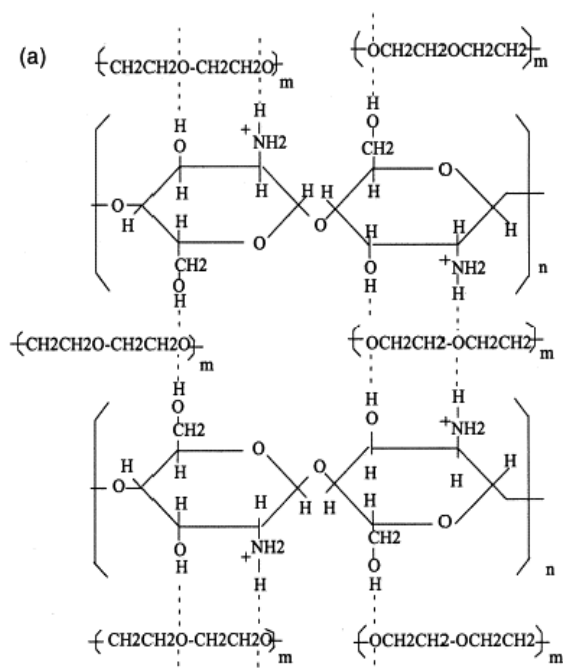
roztok připravený pro electrospinning. Dalším důvodem je skutečnost, že oba aldehydy jsou považovány za toxické (Leung, 2001). Glutaraldehyd je považován za neurotoxický a u glyoxalu jsou známy mutagenní účinky (Murata-Kamiya a kol., 1997).

Vedle dialdehydů může být síťujícím činidlem pro chitosan diethyl squarate (3,4-diethoxy-cyklobut-3en-1,2-dione), (De Angelis a kol., 1998), kyselina šťavelová (Hirano a kol., 1990) nebo genipin (Mi a kol., 2000). V současnosti chybí dostatek dat o biokompatibilitě diethylsquaratu, u kyseliny šťavelové byla prokázána toxicita in vitro pro krysy (Klug a kol., 2001). Genipin je pojednán v kapitole 11.3.5. (Síťování genipinem). Biokompatibilita genipinu s lidským organismem dosud nebyla plně zdokumentována, ale cytotoxicita in vitro nebyla prokázána.

Další cestu ve vytváření kovalentně zesíťovaných sítí, blízkých HPN, lze realizovat za využití vodorozpuštěných biokompatibilních polymerů s funkčními skupinami. Takovými funkčními biopolymery mohou být například poly(ethylenglykol) diakrylát (Kim a kol., 1995), telechelický PVA (Crescenzi a kol., 1997) nebo dialdehydy odvozené od poly(ethylenglykolu).

Příprava HPN zahrnuje využití přídatných polymerů nesoucích reaktivní skupiny, které jsou schopné síťovat s chitosanem. Může to být např. želatina nebo kolagen, které nesou aminové skupiny a jsou schopny reagovat přes glutaraldehyd s chitosanem (Yin a kol., 2000).

Pro přípravu semi-IPN jsou využitelné polymery bez funkčních skupin jako je např. polyether (Guan a kol., 1996), polyvinylpyrrolidon (PVP), (Risbund a kol., 2000), polyethylenoxid (Khalid a kol., 1999), poly-N-isopropylakrylamid (Wang a kol., 2000). Poslední dva uvedené polymery mohou být využity i pro přípravu plně IPN (obr. 32). Zapojení adičního polymeru do vytvářené sítě dovoluje přípravu pH senzitivních botnajících systémů, jejichž charakteristika závisí na hydrofilitě přidaného polymeru.

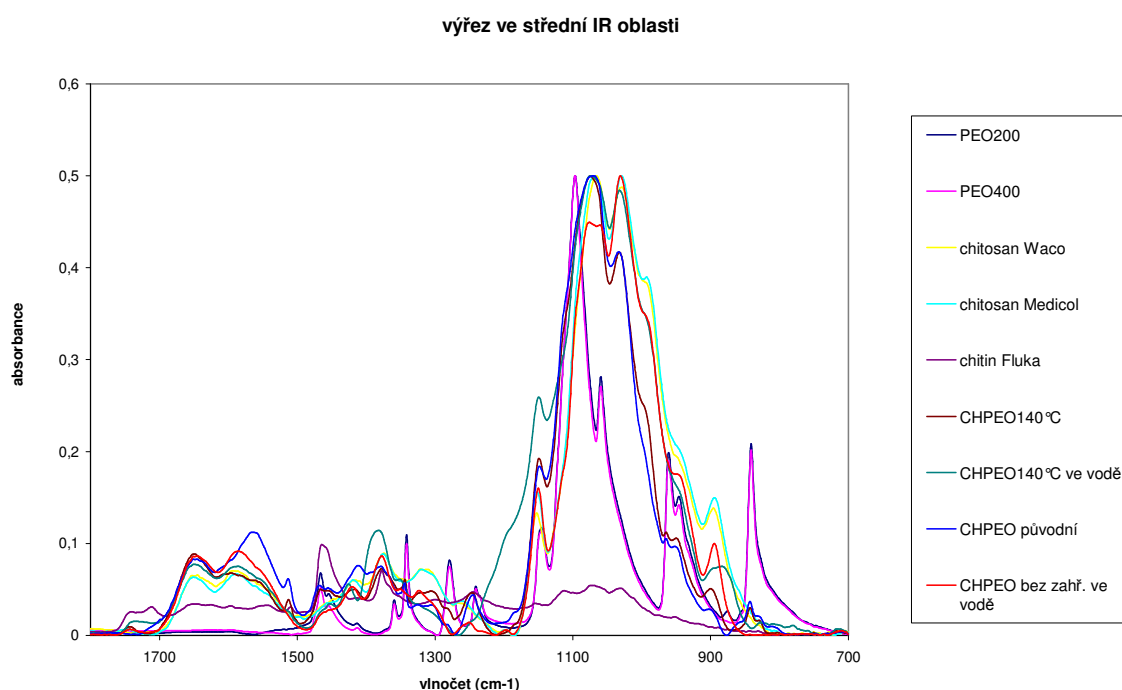


Obr. 32 Vznik vodíkových můstků ve směsi chitosan/PEO s vysokým podílem PEO

Pro přípravu semi-IPN jsou využitelné polymery bez funkčních skupin jako je např. polyether (Guan a kol., 1996), polyvinylpyrrolidon (PVP), (Risbund a kol., 2000), polyethylenoxid (Khalid a kol., 1999), poly-N-isopropylakrylamid (Wang a kol., 2000). Poslední dva uvedené polymery mohou být využity i pro přípravu plně IPN (obr. 32). Zapojení adičního polymeru do vytvářené sítě dovoluje přípravu pH senzitivních botnajících systémů, jejichž charakteristika závisí na hydrofilitě přidaného polymeru.

10.5.1. Stabilita chitosanových hydrogelů ve vodě

Zabývala jsem se zejména stabilitou hydrogelu v deionizované vodě vytvořeného z chitosanu a PEO v nanovlákněné formě a to s ohledem na (i) jeho stabilitu a (ii) existenci kovalentních vazeb, které by prokázaly síťovací reakci mezi funkčními skupinami chitosanu a koncovými skupinami PEO. Nanovlákněné vrstvy ze směsi chitosan/PEO byly hodnoceny pomocí FTIR po (i) zahřátí na dvě různé teploty a (ii) po 24hodinové extrakci v deionizované vodě a srovnány s vrstvami bez úpravy.



Obr. 33 IČ spektrum samostatných komponent a binární směsi chitosan/PEO ve střední oblasti (výřez)

Střední IČ oblast:

Vibrační přechody ze základní vibrační hladiny na první vibrační.

Popis spekter:

Chitosan:

3315 cm^{-1} : valenční vibrace N-H vazby ze skupiny $-\text{NH}_2$ + valenční vibrace vazby $-\text{OH}$

2876 cm^{-1} : valenční vibrace C-H vazeb

1648 cm^{-1} : valenční vibrace C=O vazby (chitin)

1586 cm^{-1} : deformační vibrace vazby N-H ze skupiny $-\text{NH}_2$

Nižší vlnově: vibrace molekuly jako celku – skeletální vibrace

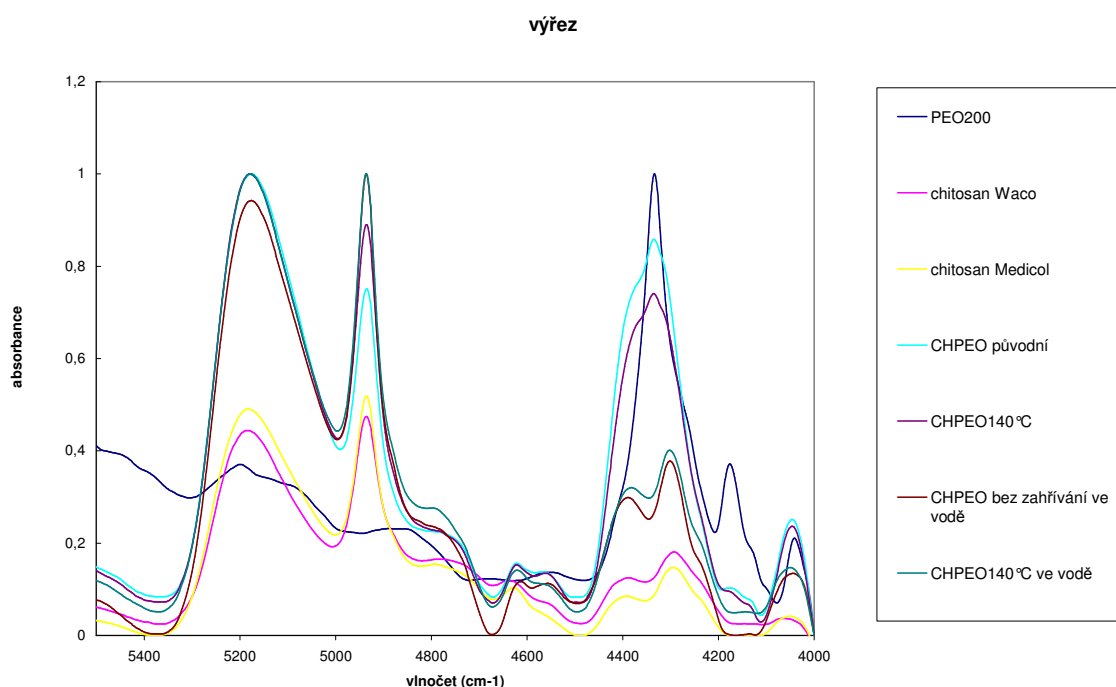
Polyethylenoxid:

2870 cm^{-1} : valenční vibrace C-H vazeb ze skupiny $-\text{CH}_2-$

1462 cm^{-1} : deformační vibrace vazby C-H ze skupiny $-\text{CH}_2-$

Níže skeletální vibrace

Po vyhodnocení spekter na obr. 33 lze konstatovat následující fakta: (i) polyethylenoxid se vodou z nanovlákněné vrstvy chitosan/PEO vymývá, (ii) ve spektru po vymytí vodou bez zahřívání jsou stopy vody, a (iii) nic nenasvědčuje strukturním změnám chitosanu po úpravách teplem v přítomnosti PEO.



Obr.34 IČ spektrum samostatných komponent a binárních směsí chitosan/PEO v blízké oblasti (výřez)

Blízká IČ oblast:

Výřez spektra chitosan/PEO (obr. 34) prokazuje přítomnost násobných vibrací, tzv. „overtonů“. Jedná se o vibrační přechody z hladin vyšších než je základní na hladinu o jednotku vyšší. Ve všech případech se jedná o valenční vibrace. Čím je vyšší vlnověet, tím se jedná o vyšší hladinu, na níž přechod nastává.

Popis spekter:

Chitosan a jeho charakteristické vibrační pásy:

4280 cm^{-1} : vibrace vazby C-H ze skupiny $-\text{CH}_2-$

4375 cm^{-1} : vibrace vazby C-H ze skupiny $-\text{CH}_3$

4765 cm^{-1} : vibrace vazby N-H ze skupiny $-\text{HN}-$

4928 cm^{-1} : vibrace vazby N-H ze skupiny $-\text{NH}_2$

5174 cm^{-1} : kombinace vibrací vazeb O-H, N-H z $-\text{NH}-$ i $-\text{NH}_2$

5617 cm^{-1} : vibrace vazby C-H ze skupiny $-\text{CH}_2-$

5770 cm^{-1} : vibrace vazby C-H ze skupiny $-\text{CH}_3$

6528 cm^{-1} : vibrace vazby N-H ze skupiny $-\text{NH}_2$

6766 cm^{-1} : kombinace vibrací vazeb O-H, N-H z $-\text{NH}-$ i $-\text{NH}_2$

8180 cm^{-1} : různé C-H vazby

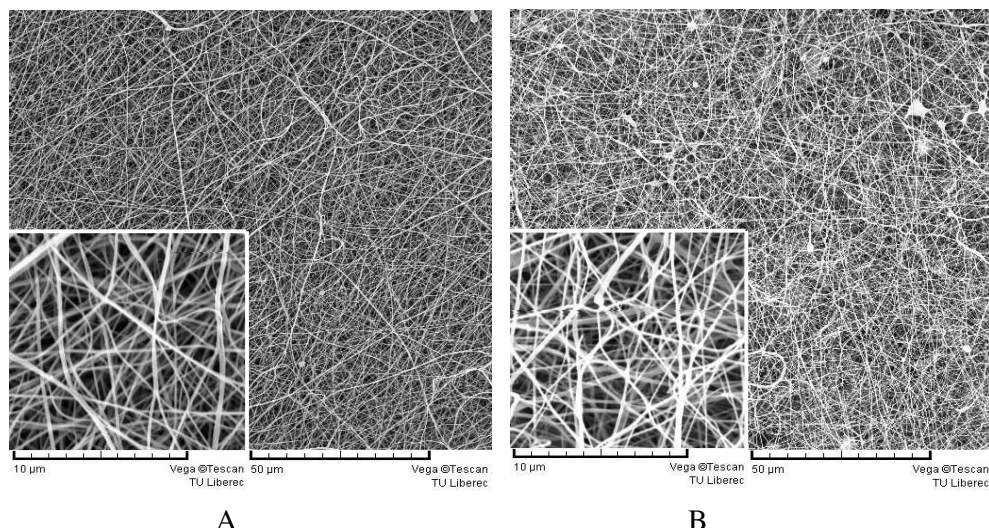
9540 cm^{-1} : vibrace vazby N-H ze skupiny $-\text{NH}_2$

Polyethylenoxid:

Z PEO jsou v blízké IČ oblasti aktivní pouze C-H vazby. Po vyhodnocení spekter (obr. 33, 34) lze konstatovat následující fakta: (i) polyethylenoxid se vymývá vodou z nanovlákněné vrstvy chitosan/PEO (ii) při úpravě zahříváním po působení vody i bez působení vody nedochází ke strukturním změnám chitosanu. Poměr intenzit peaků N-H vazeb z $-\text{NH}_2$ skupin a peaku kombinační vibrace O-H a N-H vazeb se významně nemění.

Více než dvouleté experimenty se elektrostatickým zvlákněním chitosanu mohou být tedy shrnuty do následujících poznatků:

Roztok čistého chitosanu není zvláknitelný technologií Nanospider z vodných roztoků kyseliny octové, mléčné, chlorovodíkové, trichloroctové, ani z jiného rozpouštědla včetně hexafluoroizopropanolu pro vysokou viskozitu roztoku a povrchového napětí, které se ustanovují při koncentracích chitosanu nezbytných pro electrospinning. Přídavek PEO redukuje vzájemné sdružování chitosanových řetězců a polyelektrolytový efekt. Elektrostaticky zvlákněné směsi polymerních roztoků chitosan/PEO dovolují vytvořit nanovlákněné vrstvy bez defektů se submikronovými průměry vláken, které jsou v současné době testovány in vitro jako extracelulární matrice pro proliferaci chondrocytů. Potvrzuje se schopnost chitosanu eliminovat bakterie a tím snižovat možnost infekce.



Obr. 35 Zvlákněná směs chitosan /PEO na laboratorním Nanospideru, (Mag. 1 000x a 50 000x); A- poměr chitosan /PEO je 8:2, přídavek Tritonu X-100 2 hm%, B-poměr chitosan/PEO je 7:3 bez přídavku Tritonu X-100.

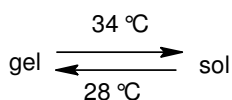
Pro elektrostatické zvláknování jsou vhodnější chitosany s nižší molekulovou hmotností, přibližně 150.000 až 200. 000 g.mol⁻¹. Vyšší molekulová hmotnost vede již při nízké koncentraci polymeru k vysoké viskozitě a povrchovému napětí, které nemůže být překonáno účinkem elektrostatického pole do 70 kV. Přestože někteří autoři, např. Queen (2006) upřednostňují pro přípravu chitosanových roztoků kyselinu octovou vyšších koncentrací (60–80 hmot. %), naše experimenty výhodu vyšší koncentrace jednoznačně nepotvrzují. Zbytkové rozpouštědlo musí být před biomedicinálními aplikacemi důkladně odstraněno, a to buď odpařením (b.v. kyseliny octové 117,9 °C) nebo extrakcí v de-ionizované vodě. Vyšší koncentrace zbytkové kyseliny extrakci do vody neumožňuje, protože dochází k okamžitému rozpouštění. Extrakci do vody musí předcházet zneutralizování zbytkové kyseliny v 0,01 M NaOH. Pokud má být připravena vrstva s obsahem chitosanu vyšším než 90 hmot. %, je nezbytné snížit povrchové napětí přídavkem neionogenní povrchově aktivní látky, např. Triton X-100 a ovlivnit konformaci molekul přítomného polyelektrolytu přídavkem roztoku soli, např. chloridu sodného (obr.35).

11. Želatina

11.1. Charakteristika želatiny

Želatina je protein získávaný částečnou kyselou nebo alkalickou hydrolyzou živočišného kolagenu, extrahovaného z kůže, kostí, chrupavek, vazů, atd. Z hlediska teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu jsou rozlišovány tři pochody: (i) štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvartérní struktury, (ii) denaturace na úrovni terciální struktury, a (iii) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni. Zásah do struktury polypeptidového řetězce má charakter degradace, depolymerizace je jevem nežádoucím. Čím méně těchto vazeb je rozštěpeno, tím lepší fyzikálně chemické vlastnosti želatina má.

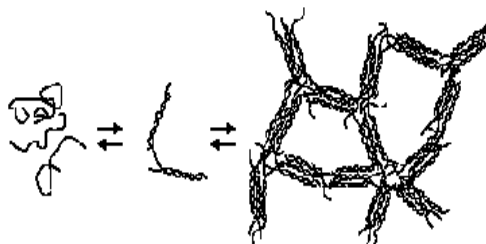
Typickou vlastností želatiny je přechod sol-gel, který poněkud komplikuje elektrostatické zvláknování. Zvláknovat je proto třeba při teplotě asi 40 °C z vodného roztoku nebo za normální teploty z roztoků kyseliny mravenčí nebo octové, respektive jejich směsi. Gel želatiny jeví tixotropii, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Jedná se o přeměnu inverzní, nikoliv však vratnou.



Z hlediska složení aminokyselin je možné želatinu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Jsou odstraněny nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidy a tuky (Babel, 1996).

Pro zamýšlené elektrostatické zvláknění roztoku želatiny bylo třeba se dobře obeznámit s jeho vlastnostmi, danými především teplotou, koncentrací, případně přítomností dalších substancí. Dříve než se mohlo přistoupit k hledání možných způsobů síťování želatinových nanovláken, bylo třeba zvládnout velmi obtížný electrospinnig tepelně labilního roztoku.

Při dlouhodobém skladování mohou velmi koncentrované roztoky želatiny vykazovat oblasti s lokálním uspořádáním (krystalita). Bylo zjištěno, že pevnost gelu je přibližně úměrná druhé mocnině koncentrace proteinu (mimo velmi zředěné gely blízko minimální koncentrace). Pevnost gelu závisí na spojeních vodíkovými můstky, proto zvýšením teploty nebo přidáním činidel potlačujících vznik vodíkových můstků, jako je např. bromid litný nebo sulfokyanid draselný, lze pevnost gelu oslabit (obr. 36).



Obr. 36 Schéma formování gelu

11.1.1. Chemické složení želatiny

Želatina je nestejnorodá směs jedno-, nebo více-řetězcových polypeptidů, z nichž každý má levotočivou helikální konformaci, skládající se z 300–4000 aminokyselinových zbytků (AMK).

V želatině je obsaženo 18 aminokyselin s přibližným procentuálním zastoupením, ukázaným v tab. 2. Tyto hodnoty se mění v závislosti na zdroji suroviny a procesu výroby (Stevens, 1992). Přestože želatina obsahuje v suchém stavu 98–99 % proteinu, má nižší nutriční hodnotu než ostatní proteiny, pro vysoký obsah ne-esenciálních aminokyselin - glycinu a prolinu.

Tab. A

Glycin	Prolin	Hydroxyl-prolin	Kyselina glutamová	Alanin	Arginin	Kyselina aspargová	Lysin*	Serin	Leucin
21	12	12	10	9	8	6	4	4	3

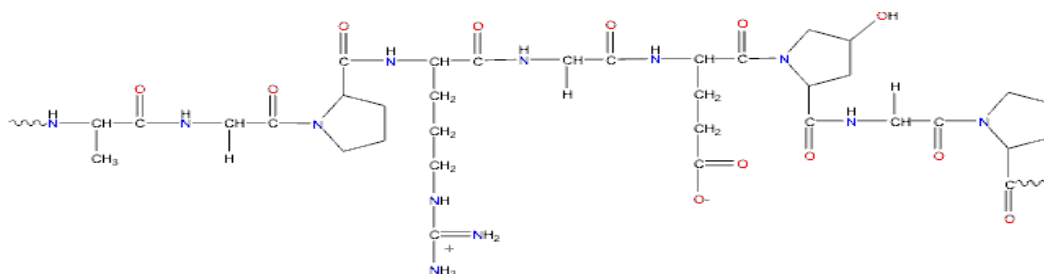
Tab. B

Valin	Fenylalanin	Threonin	Isoleucin	Hydroxylysin	Methionin	Histidin	Tyrosin
2	2	2	1	1	< 1	< 1	< 0,5

Tab. 2 Složení želatiny

11.1.2. Typická strukturní jednotka

Želatina obsahuje velké množství glycinu (téměř každý třetí AMK zbytek), prolinu a 4-hydroxyprolinu. Typickou strukturou želatiny je uspořádání –Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-(obr. 37).



Obr. 37 Strukturní jednotka želatiny

11.1.3. Molekulární struktura

Trojitý helix kolagenu typu 1, který je izolován z kůží a kostí, je složen ze dvou $\alpha_1(I)$ a jednoho α_2 řetězce, z nichž každý má molekulovou hmotnost $\sim 95\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, šířku $\sim 1,5\text{ nm}$ a délku $\sim 0,3\text{ }\mu\text{m}$. Želatina se skládá ze směsi těchto tří řetězců, společně s jejich oligomery, porušenými řetězci a jinými polypeptidy (Okuyama, 2006), (obr. 38).

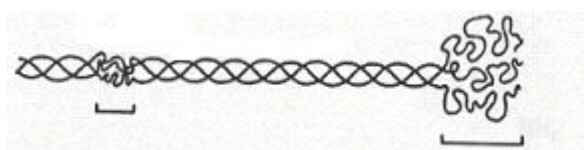
Na přeměně pravidelné struktury kolagenu na želatinu s více náhodným uspořádáním se podílejí dva základní procesy:

Prvním je tepelná denaturace, která má za následek rozštěpení vodíkových a elektrostatických vazeb, takže dojde k rozpletení kolagenového helixu na tři jednotlivé řetězce, které jsou převedeny do roztoku ve formě statistických klubek. Tento proces se uskutečňuje při zahřátí kolagenu přibližně na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sám o sobě je tento proces schopný uvolnit „matečnou želatinu“ (α řetězce kolagenu) z čerstvě formovaného kolagenu, který nemá vytvořené příčné vazby a může být extrahován z tkání neutrálními roztoky elektrolytů. Pro kolageny, které již obsahují příčné vazby, je termální denaturace nedostatečná.

Druhým procesem je hydrolytické štěpení kovalentních vazeb. Uvolnění želatinových molekul ze zesíťované struktury vyžaduje rozštěpení nejméně jedné kovalentní vazby. Ve struktuře kolagenu není žádná z vazeb tak výrazně nestálá, aby se rozštěpila jako první. Nicméně některé vazby mají větší pravděpodobnost rozštěpení, tato pravděpodobnost se ovšem liší v závislosti na pH a teplotě. Místo rozštěpení želatiny

určuje molekulární hmotnost vzniklé želatiny, počet aminokyselinových zbytků a jejich pozici vzhledem ke koncovým aminokyselinám. Náhodnost tohoto procesu způsobuje heterogenní charakter želatiny.

Ačkoliv původní zdroj kolagenu a tedy i želatiny velmi často obsahuje značné množství „nečistot“ (příměsí), jakými jsou například tuky, sulfáty, nukleové kyseliny a ionty, lze zajistit značnou čistotu produktu. Nečistoty však mohou způsobovat vedlejší reakce během zpracování a ovlivňovat tak změny v barvě, nebo čirosti želatiny. Většina nečistot je odstraněna během filtrace nerozpustných složek kolagenu.



Obr.38 Helikální a globulární domény kolagenu

Po denuraci helikální oblasti samostatných α řetězců se částečně obnoví kolagenový helix, což má za následek vytvoření 3D strukturní sítě, zadržující vodu, kterou vnímáme jako typický želatinový gel. Gel je nekonečně termoreversibilní. Nicméně vyvinutí úplného gelu (maximální gelace při dané koncentraci) je zapotřebí přibližně 16 hodin.

11.1.4. Rozpustnost želatiny

Na počátku 20. století byl veden rozsáhlý výzkum ohledně získávání a rozpustnosti želatiny v horké vodě. V průběhu času bylo zjištěno, že želatina z různých zdrojů vykazuje značně rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, a že se v mnoha směrech želatina chová odlišně od ostatních proteinů. Mnohý z těchto závěrů má dnes jen omezenou platnost, protože termín želatina se nevztahuje na skupinu podobných látek, ale na celé různorodé skupiny látek, tvořících gely, získávaných z tkání obsahujících kolagen.

Tyto skupiny se rozlišují od jednoduchých α -řetězců a dvojitých β -řetězců až po vysoce degradované mnoho-řetězcové struktury, získané chemickými a teplotními úpravami. Přítomnost několika typů ionizačních skupin na polymerních řetězcích ovlivňuje acido-bazické chování želatiny jako u jiných proteinových komplexů.

Další komplikací u komerčních želatin je, že frakcionace celkového počtu ionizovatelných karboxylových skupin závisí na způsobu zpracování. Existence elektricky

nabitých skupin ovlivňuje vzájemné interakce mezi molekulami želatiny v roztoku (mezi molekulami želatiny, molekulami rozpouštědla a mezi různými částmi jedné molekuly). Velikost těchto interakcí se mění v závislosti na pH a také závisí na celkové iontové skladbě systému, zahrnujícího elektrolyty, soli zbylé ze zpracování a rozpouštědlo.

Běžná želatina se rozpouští snadno v horké vodě. Důležitou počáteční fází při rozpouštění želatiny je botnání. Během něj je želatina schopna absorbovat vodu, a to až do desetinásobku své původní hmotnosti. Botnání probíhá za normální teploty. Doba maximálního nabotnání závisí na velikosti částic použité želatiny.

Pro velmi malé částice (0,1–0,3 mm) probíhá úplné nabotnání během několika minut, u velkých částic (nad 2,0 mm) trvá více než hodinu. Proces botnání probíhá lépe ve slabě kyselém prostředí (slabé roztoky kyseliny citrónové, nebo octové), než v samotné vodě. Botnání probíhá pomaleji v roztocích obsahujících vysoké koncentrace solí nebo cukrů. Během rozpouštění, pokud je použito vysoké teploty, nebo při nízkém pH, může docházet k změně původních vlastností (zabarvení, schopnost gelace). Běžná dostačující teplota pro úplné rozpouštění je 50–60 °C, což je teplota, při které nedochází k výraznému zhoršení gelační schopnosti. Např. po dvou hodinách při teplotě 60 °C je úbytek schopnosti gelace asi 5 %, (Gelita, 2007).

Pouze silně degradované želatiny se rozpouštějí ve studené vodě tak, aby poskytly stabilní roztok. Běžné želatiny se pomalu rozpouštějí ve studené vodě, pokud jsou v dostatečné koncentraci přítomna činidla rozrušující vodíkové můstky, jako jsou například močovina, bromid litný, nebo thiokyanid draselný, atd. (Ward a Courts, 1977). Při takovýchto podmínkách se neobjevuje botnání. Želatina je rozpustná v širokém rozmezí pH, pokud není chemicky modifikována.

11.1.4.1. Rozpustnost v roztocích obsahujících ionty

Většina proteinů může být dispergována ve vysoce koncentrovaných kyselinách. Například želatina může být dispergována ve směsi 60–75 % kyseliny octové s 25–40 % kyselinou fosforečnou. Takovýto roztok je stabilní po dobu 10–15 dní bez podstatnějších chemických změn. Kationty jako například Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} zvyšují botnání želatiny ve vodném roztoku.

11.1.4.2. *Rozpustnost v nevodných rozpouštědlech*

Želatina je rozpustná v polárních rozpouštědlech, která mají donorový efekt H-vazeb stejný nebo větší, než ethan-1,2-diol. Výjimkou z tohoto pravidla je formamid a jiné cis-amidy, které přestože jsou méně protické, než ethan-1,2-diol díky specifické solvataci polypeptidických vazeb. Příklady používaných organických rozpouštědel jsou: 1,1,1-trifluorethanol, nebo 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol.

11.2. *Faktory ovlivňující gelaci*

Při elektrostatickém zvlákňování by ke gelaci v ideálním případě mělo docházet bezprostředně po vydloužení vlákna. Pro dokonalé porozumění procesu bude vedle samotné gelace v následujících odstavcích diskutována teplotní historie gelu a vliv rozpouštědla.

Mnoho fyzikálních vlastností gelu se mění v čase, a to i při konstantní teplotě. Pro porovnávání gelových systémů při konstantní teplotě je nutné vždy definovat stáří gelu. Například modul pružnosti ve smyku rapidně stoupá několik hodin po vytvoření gelu, po určité době se stále nepatrně zvyšuje a nikdy není dosaženo plně konstantní hodnoty. Po několika hodinách dochází, však již k velmi malé změně vlastností hovoříme o *rovnovážném gelu*. Při podchlazení rovnovážného gelu a jeho opětovném ohřátí na teplotu měření jsou vlastnosti původního gelu téměř dokonale obnoveny, nicméně při zahřátí gelu na vyšší teplotu a následném ochlazení na původní teplotu, vlastnosti rovnovážného gelu již obnoveny nejsou. Toto chování je typické pro polymerní síťové struktury, vytvořené sekundárními vazbami. Formování sítě probíhá za ustanovení rovnováhy mezi interakcemi polymer-polymer a interakcemi polymer-rozpouštědlo, tato rovnováha je silně závislá na teplotě, proto tedy *struktura gelu závisí na teplotní historii systému*.

Na molekulární úrovni je gel nestejnorodý a vyskytuje se zde celé spektrum vazebných interakcí, jako celek je však gel izotropní.

Pro vytvoření gelu musí být v molekule želatiny nejméně dvě vazebná místa, a tudíž je nutná určitá minimální molekulová hmotnost. Ward a Saunders (1958) stanovili tuto minimální hodnotu okolo $15\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což je přibližně $1/6$ hmotnosti α -řetězce. Nad touto hodnotou roste gelovací schopnost spolu s rostoucí molekulovou hmotností, horní hranice není určena, ale při dosažení hodnoty $90\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ modul pružnosti ve

smyku mírně klesá. Je vhodné připomenout, že molekuly želatiny mohou mít molekulovou hmotnost až 10^6 g.mol^{-1} .

Gelace závisí na pH a mimo oblast pH 4–10 dochází k prudkému poklesu gelovací schopnosti, která však není degradací. Se vzrůstající koncentrací gelu klesá závislost gelace na pH. Neelektrolyty, jako například cukry, mohou zvyšovat pevnost gelu a teplotu jeho rozpouštění.

11.3. Sítování želatiny

V literatuře je uvedeno několik fyzikálních a chemických metod vedoucích k sítování kolagenních materiálů. Fyzikální metody jsou obecně méně účinné a zahrnují dehydrotermální působení UV záření (Bottoms a kol., 1966; Fujimori, 1965).

Mnoho sloučenin, jako jsou formaldehyd, glutaraldehyd, karbodiimid a dextran byly využity k chemické modifikaci želatiny pro biomedicínální aplikace. Především glutaraldehyd (GTA) je široce využíván pro svou vysokou účinnost při stabilizaci kolagenních materiálů (Khor, 1977). Sítování kolagenních materiálů založené na GTA zřetelně snižuje jejich biodegradovatelnost, a činí tyto materiály biokompatibilní a netrombogenní, čímž chrání jejich integritu, pevnost a flexibilitu. GTA je snadno dostupný a schopný v relativně krátkém čase vyvolat sítovací reakci. Ačkoliv jsou uváděna jiná vhodná sítovací činidla pro snížení cytotoxicity, nejsou podle Sunga a kol., (1999) srovnatelná s GTA. Riziko cytotoxicity se snižuje s koncentrací GTA roztoku nebo opatřeními před aplikací (Goissis, 1999).

Sítování želatiny je nejčastěji prováděno ve vodných roztocích. Koncentrace želatiny je důležitým faktorem, neboť vzdálenost molekul určuje, zda sítování bude probíhat intermolekulárně, nebo v rámci možností intramolekulárně. Intermolekulární sítování zvyšuje molekulovou hmotnost polymeru. Důsledkem sítování je nárůst viskozity. Při pokračujícím sítování se roztok stává viskoelastickým a postupně přechází v pevný gel, který má zvýšenou teplotu tání a není již možné ho převést na kapalinu.

Pokud je želatina sítována již v gelovém stavu, objeví se značný nárůst pevnosti. Vlivem vyšší koncentrace polymeru, vysušené želatinové filmy umožňují těsnější sítovanou strukturu, než vodné roztoky, ale bývá obtížné docílit dostatečné penetrace sítovacího činidla. Efektivita v takovýchto podmínkách je dosažena obvykle pouze malými molekulami, například formaldehydem. Sítování má za následek menší botnavost, a tím lepší rozměrovou stabilitu a lepší mechanické vlastnosti.

Tvorba chemických vazeb mezi molekulami želatiny probíhá zejména reakcí aminových a hydroxylových skupin. Většina síťovacích činidel má dvě či více funkčních skupin a mohou tedy reagovat s více různými molekulami. Výjimkou z tohoto pravidla je formaldehyd.

Obecně rychlost síťování želatiny kromě její koncentrace ovlivňuje (i) koncentrace síťujícího činidla, (ii) koncentrace vodíkových kationtů, pro formaldehyd a glyoxal se pH pohybuje v rozmezí 5,5–7,5 a podle Daviste a Tabora (1963) je nepřímo úměrné rychlosti síťovací reakce a (iii) koncentrace želatiny.

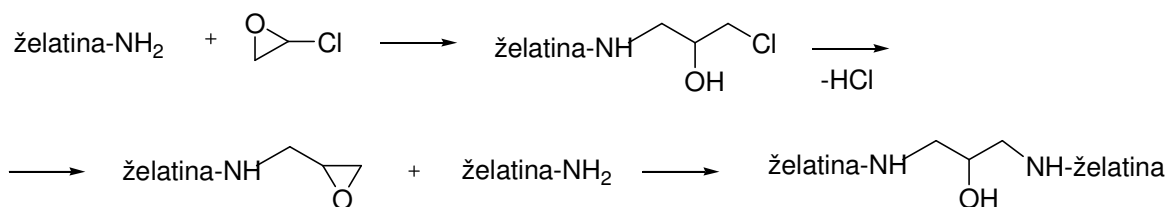
$$\text{Rychlost síťování} = \frac{[\text{želatina}]^2 [\text{síťující činidlo}]^n}{[H^+]^n} \quad (20)$$

Kde $n = 2$ pro formaldehyd a $n = 1$ pro glyoxal. Toto platí při normálních koncentračních podmínkách, ale nikoliv při reakci s formaldehydem při vysokých koncentracích nebo při reakci s glyoxalem při vysokém pH.

Ačkoliv v literatuře je zmíněna řada reakcí s různými síťovacími činidly, budou dále uvedeny jen některé.

11.3.1. Síťování epoxidů

Epichlorhydrin je tradičním síťujícím činidlem (Clark a Court, 1977) a jeho reakce probíhá ve dvou fázích, jak ukazuje následující reakční schéma (obr. 39):



Obr. 39 Síťování želatiny epichlorhydrínem

Běžně jsou také využívány k síťování bifunkční epoxidy (V.E.B.-Filmfabrik Agfa Wolfen, 1960) a kvartérní amoniové soli se dvěma, nebo více epoxidovými skupinami, jak popisuje např. Burness, (1965).

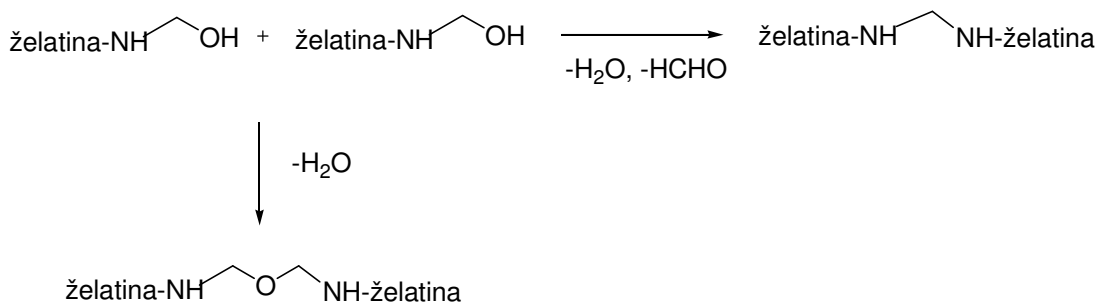
11.3.2. Sítování aldehydy a ketony

Důležitost postranních aminových skupin na želatině při sítování aldehydy je obecně akceptována (Gustavson, 1956). Jejich odstranění při reakci s kyselinou dusičnou nebo při blokaci acetylací vznikají produkty, které nejsou zesítovatelné formaldehydem.

Formaldehyd je pravděpodobně nejrozšířenějším činidlem pro sítování proteinů, jeho využití pro sítování želatiny popsali již Kragh (1958) a Fuchs (1961). Mechanismus jeho reakce s želatinou začíná vytvořením methylového substituentu na aminoskupině. Protonizovaná amino-skupina na želatině reaguje s aldehydem za vzniku methylolových sloučenin a při reakci se uvolňuje vodíkový ion.



Ve velmi zředěných roztocích tato reakce neprobíhá dále, protože vzdálenost mezi molekulami neumožňuje vzájemné zapojení molekul. Pokud je umožněn kontakt s další molekulou, na které je vytvořen N-methylolový substituent, další průběh reakce může probíhat dvěma způsoby (obr. 40).

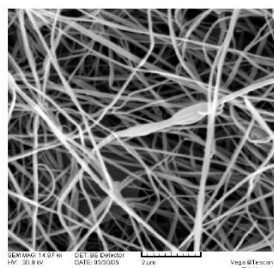


Obr.40 Schématické sítování želatiny formaldehydem

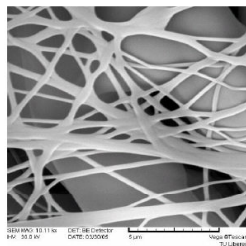
Methylenový můstek je kratší a tedy stabilnější v porovnání s dimethylen-etherovým můstkem. Použití formaldehydu je problematické v obtížné kontrole rozsahu reakce, zápachu a hlavně toxicity. Z těchto důvodů se využívají spíše polyformalíny, jako je např. paraformaldehyd, ale také hexamethylentetraamin. Vyšší monoaldehydy jsou také

využívány jako síťovací činidla, ale jejich účinnost klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce. Síťování aldehydy je urychlováno přítomností organických karboxylových kyselin

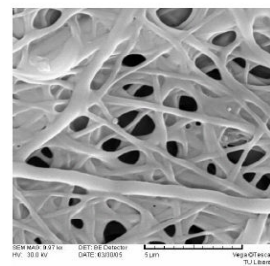
O síťování nanovláken vytvořených ze želatiny parami formaldehydu jsme referovali (Komárek, Martinová, 2006). Zjevným nedostatkem tohoto postupu je vlhlost obsažená v parách nad vodným roztokem formaldehydu, která způsobuje současnou změnu morfologie nanovláken. Mnohem efektivnější by bylo síťování nanovláken ze želatiny, ale i např. z PVA, plynným formaldehydem, kde by blokace hydroxylových skupin vedla k zásadnímu omezení botnání PVA ve vodném prostředí.



Obr. 41 Želatina zvlákněná z vodného roztoku kyseliny octové, Mag.10 110 x



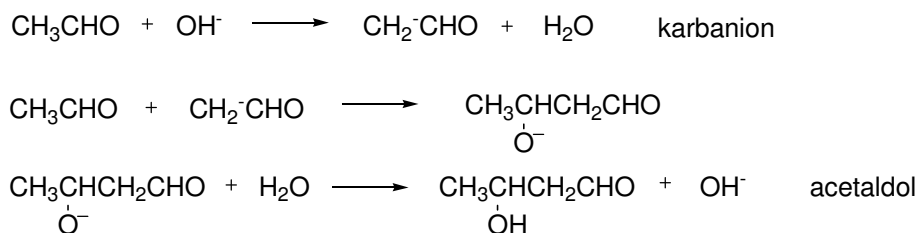
Obr. 42 Želatina síťovaná formaldehydovými parami, expozice 12 hod, Mag.10 110 x



Obr. 43 Želatina síťovaná formaldehydovými parami, expozice 72 hod, Mag.10 110 x

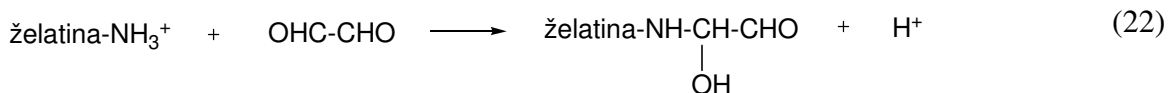
Z obrázků 41, 42, 43 je patrné, že delší čas expozice nanovláken parám formaldehydu vede k větší ztrátě morfologie nanovláken. Míra zesítění testovaná odolností nanovláčenné vrstvy v destilované vodě po 24 hod je dostatečně vysoká, aby zabránila rozpouštění.

Z dialdehydů jsou využívány glutaraldehyd (GTA) a glyoxal (Davis a Tabor, 2003; Zhang a kol., 2006). GTA reaguje s aminovými skupinami v želatině za vzniku iminových vazeb (Mi a kol., 2001). Tyto sloučeniny reagují mechanismem aldolové kondenzace (obr. 44).



Obr.44 Schéma aldolové kondenzace

Stejně jako probíhá reakce želatiny s formaldehydem, nejpravděpodobnější je reakce s glyoxalem, při které vzniká methylolový derivát podle schématu:



Jinou alternativou je podle Davise a Tabora (1963) reakce hydroxylové skupiny, vzniklé po navázání eliminovaného vodíkového kationu na druhou aldehydickou skupinu glyoxalu (rov. 22), s protonizovanou aminovou skupinou želatiny, při které dochází k zesíťování díky přítomnosti náboje.



nebo



Mechanismus reakce ketonických skupin s proteiny není plně znám. Pravděpodobné produkty reakce s aminoskupinami jsou Shiffovy báze, nebo α -karbinolaminy. Acetonylacetonu a biacetyly byly potvrzeny firmou Ilford (1963, 1966).

11.3.3. Sít'ování různými oxidačními činidly

Využití chlóru pro zvýšení viskozity popisuje Farbenfabriken Bayer A.-G. (1965). Needles (1967) popisuje podobný efekt po působení peroxydisulfátu. Při těchto reakcích dochází k oxidaci hydroxylových skupin aminokyselin jako je např. 5-hydroxylysin nebo hydroxyprolin na skupiny aldehydické, které následně reagují s okolními aminoskupinami. Dále pak reakce probíhá podle reakčního mechanismu jako u aldehydů.

11.3.4. Sít'ování za účasti enzymů

Enzymy jsou makromolekulární látky bílkovinné povahy, které fungují jako přírodní katalyzátory a jsou nedílnou součástí většiny chemických procesů v každé živé buňce. Chemické reakce katalyzované enzymy jsou velmi specifické a mohou probíhat za velmi mírných podmínek. V průběhu enzymově katalyzovaných reakcí většinou nevznikají vedlejší produkty.

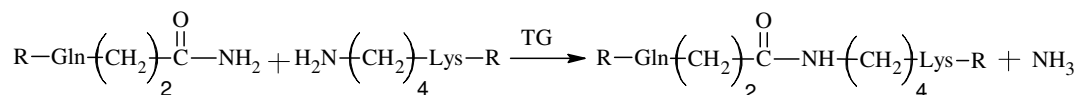
Tak zvané sít'ující enzymy mohou být využity v potravinářském průmyslu, zejména v mlékárenském a masném, protože zlepšují strukturu výrobku, jeho stabilitu a vázání vody. Sít'ující enzymy mohou vázat kovalentními vazbami biopolymery přítomné v potravinářských matricích. Sít'ování může být realizováno mezi proteiny, proteiny a sacharidy nebo mezi sacharidy.

Jestliže jsou popsány sít'ující enzymy pro peptidy využívané v potravinářském průmyslu, je nasnadě, že by se mohly osvědčit též pro aplikace v biomedicíně.

Enzymatické sít'ování je metoda, která získává v posledních deseti letech stále větší pozornost (Motoki a Seguro, 1998; Faergamed a kol., 1998a, 1999b; Sørensen a kol., 1999). Jediným sít'ujícím enzymem, který je průběžně dostupný pro katalýzu tvorby kovalentních vazeb mezi molekulami proteinů, je transglutamináza (TG), (Dickinson, 1997). TG je klasifikačně označena systematickým názvem [R-glutaminy-peptid:amino- γ -glutamyl-transferase (EC 2.3.2.13) v Enzyme Commission Nomenclature System (ECNS) (Ikura a kol., 1980; Aboumahmoud a Savello, 1990; Motoki a kol., 1990; Oh a kol., 1993; Zhu a kol., 1995).

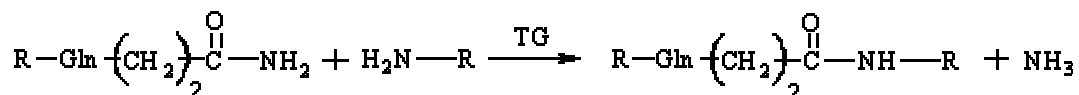
Komerční TG byla původně získávána výhradně ze živočišných tkání. V nedávné době se rozšířila technologie za využití mikrobiální fermentace. (Zhu a kol., 1995), (Dickinson, 1997). TG katalyzované reakce jsou schématicky znázorněny na obr. 45, (Zhu a kol., 1995; Motoki a Seguro 1998; Sharma a kol., 2001).

TG katalyzuje acyl-transferovou reakci, ve které γ -karboxamidové skupiny peptidicky vázaných glutaminylových residuí jsou acylovými donory. Enzym mění v široké různorodosti primární aminy a čpavek na karboxamidové skupiny glutaminových residuí. Podrobný průběh reakce uvádí (Zhu a kol., 1995; Sharma a kol., 2001).

Síťování

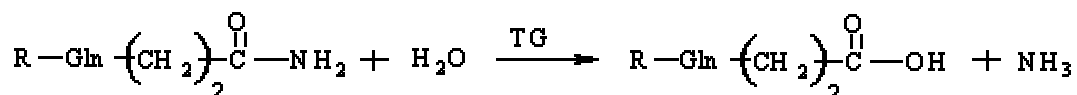
Glutamyl residuum

Lysyl residuum

Začlenění aminu

Glutamyl residuum

Amin

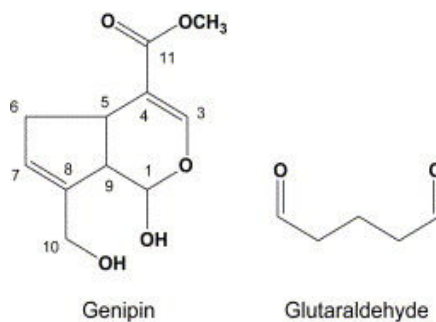
Deamidace

Glutamyl residuum

Obr. 45 Reakce katalyzovaná TG

11.3.5. Síťování gepinem

Genipin (obr. 46) je vynikající přírodní síťující činidlo pro proteiny, kolagen, želatínu a chitosan (Liang, 2003; Sung, 1999; Bigi, 2002; Butler, 2003; Yao, 2004; Liang, 2004). Genipin má nízkou hodnotu akutní toxicity charakterizovanou hodnotou letální dávky (LD₅₀) 382 mg/kg pro myši, je méně toxický než GTA, a proto je hojně využíván také ve farmaceutickém průmyslu.



Obr.46 Strukturní vzorec genipinu

Genipin je aglykon odvozený od iridoidu glykosidu, který je označován jako geniposid a je obsažen v ovoci *Gardenia jasminoides* Ellis, které je známo z přírodní medicíny ve východní Asii. Jako potravinářské barvivo vytváří tmavě modrý odstín.

Genipin a GTA reagují s želatinou rozdílným reakčním mechanismem, který částečně opodstatňuje rozdílnou reakční rychlost. Genipin reaguje v želatině s aminokyselinami, které obsahují aminové postranní skupiny, jako je lysin a arginin (Sung, 1998). Tato reakce probíhá dvěma různými mechanismy (Mi, 2001; Mi, 2000). Jedním je nukleofilní atak na aminovou skupinu, který může vést k vytvoření heterocyklického aminu. Druhý mechanismus zahrnuje nukleofilní substituční reakci, která má za následek nahrazení esterové skupiny genipinu sekundární amidovou vazbou. Tato druhá reakce je pomalejší než první. Butler (2003) a Mi a kol., (2001) předpokládali, že pomalejší reakce genipinu (ve srovnání s GTA) by mohla být způsobena sterickou zábranou sítujících skupin.

11.3.6. Sítování UV zářením

Sítování želatiny modifikované glycidylmethakrylátem (GMA) s přídavkem Darocuru 1173 a následným UV ozářením zmiňuje např. Koepff a kol., (1998). Studie paralelní sítovací reakce na želatině ve formě vláken a filmů vedou opakovaně k určitému paradoxu, který spočívá ve skutečnosti, že stejný materiál, za stejných podmínek, zesítuje bezproblémově ve formě filmu o tloušťce 1-2 mm, ale nezesítuje ve formě nanovláken. Vysvětlení lze hledat v omezené vzájemné dostupnosti makroradikálů, které jsou produktem interakce radikálu z UV iniciátoru a polymerního řetězce. Předpokládá-li se určitý minimální stupeň vydloužení makromolekul v nanovlákně a s uvažováním skutečnosti, že polymer je pod svou teplotou zesílnění, je nasnadě, že pohyblivost segmentů polymerního řetězce v nanovlákně je mnohem omezenější, než tomu je v kompaktní vrstvě filmu se vzájemně zapletenými řetězci.

12. *Nebulizace (atomizace)*

Jak již bylo zmíněno dříve, některé polymerní roztoky vodorozpuštěných polymerů nemohou být zvláknovány společně se síťovacím činidlem, případně i s katalyzačním systémem, nezbytným pro průběh síťující reakce. Pro tyto případy se nabízí v zásadě jediná možnost, a to nános síťujícího činidla na nanovláknennou vrstvu ex post. To však s sebou přináší celou řadu komplikací, např. deformaci nanovláknenné vrstvy, nutnost mechanického odstranění nosné kapaliny a následné sušení. Aby bylo možné vyloučit, nebo alespoň minimalizovat uvedené operace, byl na KNT zkonstruován a otestován ultrazvukový nebulizér (atomizér).

Ultrazvuková atomizace nabízí charakteristiky, které ji zvýhodňují před tradičními mechanickými metodami, a umožňuje rozprašování velmi malých kapek. Rezultující šíře distribuce kapek je velice úzká a jejich střední průměr je dán excitační frekvencí (Lang, 1962). Z těchto důvodů jsou ultrazvukové nebulizéry velmi populární pro zvlhčování vzduchu a v medicíně aplikacích, kde úspěšně konkurují inhalátorům, které využívají fluorohydrogenu jako nosný plyn.

První aplikace ultrazvukových vln pro generaci kapek byla navržena Woodem a Loomisem (1927), jako praktický způsob rozprašování při využití frekvencí vln rovných nebo větších než 20 kHz. Od této doby byla vyvinuta nízkofrekvenční (20–100 kHz) a vysokofrekvenční (0,1–5 MHz) ultrazvuková zařízení. Stále však zůstává mnoho nedořešených aspektů pro dokonalé fyzikální řízení procesu. Především interakce mezi dvěma mechanismy, zahrnujícími povrchové kapilární vlny (Sorokin, 1957; Eismengen, 1959; Sindayhebura, Bolle, 1998) a hydrodynamické kavitace, jsou stále diskutovány (Söllner, 1936; Eknadiosyants, 1968).

Vzhledem k technickým omezením při praktické realizaci ultrazvukových generátorů s příslušnými měniči bylo vytvořeno mnoho systémů pracujících s nízkou frekvencí, obvykle do 400 kHz. Pro generaci kapek s typickým průměrem okolo 5 mikrometrů se doporučují frekvence řádu jednotek MHz. Ačkoliv některé reference popisují obvody pro ultrazvukovou excitaci (Zaitso, 1996), vhodné laděné ultrazvukové generátory poskytující výstupní napětí v rozsahu 50–60 V a vysokofrekvenční výkon v desítkách či stovkách W jsou velmi neobvyklé.

12.1. *Excitační systém*

Vývoj piezoelektrické keramiky v posledních desetiletích umožnil využití nových materiálů pro ultrazvukové měniče. Pro jejich vynikající elektromechanické vlastnosti a nízké výrobní náklady se tyto systémy velmi rozšířily a nacházejí uplatnění například jako zvlhčovače vzduchu pro domácnost. Kategorie piezoelektrické keramiky (PZT), založené na sloučeninách olova, zirkonia a titanu, tvoří základ většiny piezokeramických měničů pro jejich vysoké polarizační parametry. Geometrie těchto měničů je obvykle tvořena diskem ze sintrovaného materiálu s elektrodou na každé straně. Jejich elektrické chování podrobně popisuje Lozano (2003). Pro vibraci disku k dosažení dostatečně vysoké amplitudy pro atomizaci je potřebné buzení při rezonanční frekvenci. V tomto bodě je odpor jen několik ohmů a výkon je značný. Naneštěstí, jen zlomek výkonu přispívá k mechanickým vibracím, velká část se mění v teplo. Zahřátí keramiky nad tzv. Curieho teplotu způsobuje depolarizaci a měnič je nepoužitelný. Z tohoto důvodu je nutné použít laditelný generátor, schopný dodat vysokofrekvenční napětí s požadovaným výkonem, a to do 50 W.

Tvorba kapek v mikrometrových rozměrech vyžaduje frekvenci v MHz o výkonu řádově 10 W. Laditelný generátor s těmito charakteristikami je poněkud neobvyklý.

Je známo, že frekvence oscilace povrchových vln by měla být jednou polovinou aplikované frekvence, což Sindayihebura a Bolle (1998) odvodili z analýzy stability vzniku vln, která zahrnuje parametry, jako jsou průměrná tloušťka filmu h , amplituda vibrace stěny a , a viskozita μ . To jsou další parametry k budící frekvenci f , povrchovému napětí σ a hustotě kapaliny ρ_L , které jsou v původní práci Kelvina, publikované Rayleighem (1898).

12.2. *Průměr kapek*

Fyzikální základ tvorby kapek je založen na zákonu zachování energie. Rychlost kapek při ultrazvukovém rozprašování je nízká, a tak většina energie povrchové vlny je transformována do povrchového napětí kapek,

$$\frac{1}{2} m \omega^2 A^2 = N \sigma S, \quad (25)$$

kde m je hmotnost rozprášených kapek, A je vibrační amplituda, ω ($\omega = 2\pi f$) je budící úhlová frekvence, N je počet kapek, σ je povrchové napětí a střední hodnota povrchu kapky. Hmotnost rozprášených kapek je $m = N \rho V$, kde V je střední hodnota objemu kapky. Objem V a povrch S sférické kapky s průměrem D je vyjádřen jako

$$V = \frac{\pi D^3}{6} \quad \text{a} \quad S = \pi D^2 \quad (26)$$

Průměr kapky může být vyjádřen z rovnice (22) a (23) jako

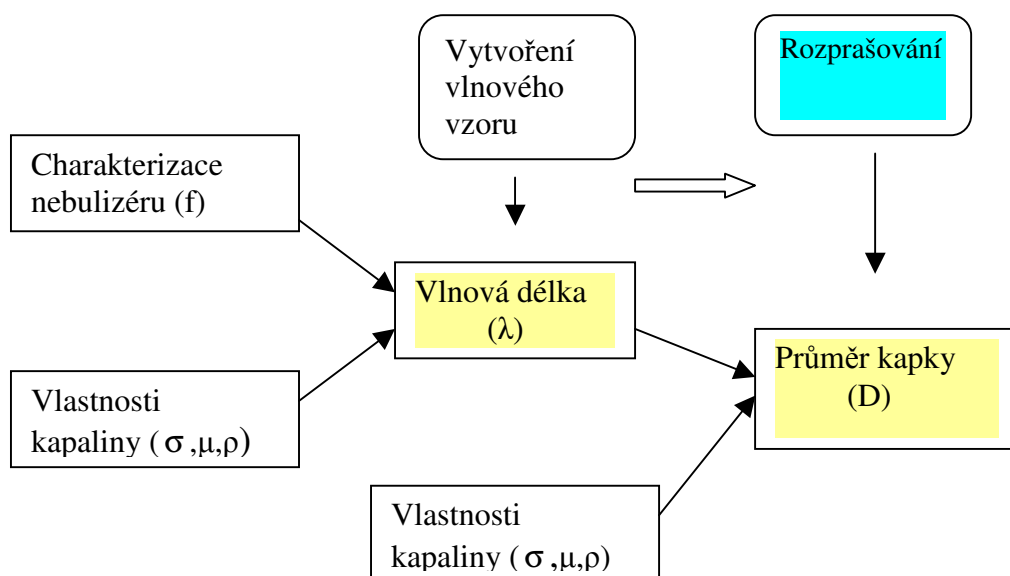
$$D = \frac{3}{\pi^2} \cdot \frac{\sigma}{\rho f^2 A^2} = \text{const.} \cdot \frac{\sigma}{\rho f^2 \lambda^2} \quad (27)$$

kde se předpokládá, že vlnová délka λ a amplituda A jsou proporcionální.

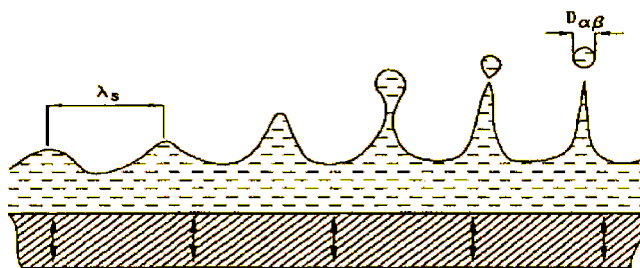
Při aplikaci vztahu $\lambda = \left(\frac{16\pi\sigma}{\rho \cdot f^2} \right)^{\frac{1}{3}}$ může být velikost kapky vyjádřena jako:

$$D = 0.73 \cdot \sqrt[3]{\frac{\sigma}{\rho \cdot f^2}} \quad (28)$$

Ultrazvuková atomizace je dvoustupňový proces: v jeho první fázi se vyvíjejí vlny na kapalinovém filmu na povrchu kapaliny, když je dosaženo resonance, amplituda roste a v druhé fázi procesu způsobuje uvolňování kapek z hřebene vlny (obr. 48). Faktory, které ovlivňují jednotlivé fáze při nebulizaci, jsou schématicky znázorněny na obr. 47.



Obr. 47 Parametry ovlivňující velikost kapky při nebulizaci



Obr. 48 . Dezintegrační mechanismus podle Drewse (1979)

Uvolňování kapek je řízeno povrchovým napětím a oscilačními silami. Energie kapalinového filmu se se ztrátou transformuje do energie kapek zahrnující kinetiku a povrchové napětí. První teoretické průkopnické práce v této oblasti byly publikovány Kelvinem (1871) a Rayleighem (1883). Kelvin odvodil dobře známou rovnici pro kapilární vlnu (29)

$$\lambda = \left(\frac{2\pi\gamma}{\rho f^2} \right)^{1/3}, \quad (29)$$

kde λ je vlnová délka, γ je povrchové napětí kapaliny, ρ znamená hustotu kapaliny a f je frekvence povrchové vln. Rayleigh modifikoval Kelvinovu rovnici a odvodil vztah

$$\lambda = \left(\frac{8\pi\gamma}{\rho F^2} \right)^{1/3}, \quad (30)$$

kde F je budící zvuková frekvence vyjádřená v rovnici jako $F = 2f$. Je třeba zdůraznit, že poslední rovnice byla získána empiricky z experimentálního měření. Další Rayleighova práce (1917), související s vysvětlením kolapsu bubliny v nestlačitelné kapalině při vlivu ultrazvukových vln, vznikla na základě teoretické práce Wooda a Loomse (1927), kteří objevili atomizaci kapalin.

Bylo pozorováno, že existuje maximální amplituda pro dobrou nebulizaci, při které odletují z povrchu kapaliny části kapalinového filmu, spíše než jednotlivé kapky. Yule a spolupracovníci (2000) zmínili ve své práci návrh Lierkeho a Griesshammera (1967), že atomizace je zahájena, když amplituda je v rozmezí 3 až 6 násobku kritické amplitudy,

a_c , pro vytvoření vlny

$$a_c = 2\nu \left(\frac{\rho}{\pi \gamma f} \right)^{1/3}, \quad (31)$$

kde ν je kinematická viskozita, γ povrchové napětí kapaliny, ρ hustota kapaliny a f je frekvence povrchové vln.

12.3. Nebulizace organických kapalin

Nános síťovacího činidla na nanovláknennou vrstvu ve formě mlhy vytvořené z jeho směsi s organickou kapalinou, která je netečná k nanovláknům, byl považován za velmi perspektivní. Způsob nánosu síťovacích činidel jsme studovali na nanovláknenných vrstvách vytvořených (i) z kyseliny polyakrylové, (ii) z kopolymeru HEMA a sodné soli kyseliny methakrylové a (iii) ze směsi PVA a chitosanu. Nejpodrobněji bylo rozpracováno síťování kyseliny polyakrylové pomocí ultrazvukově vytvořené mlhy s obsahem síťující komponenty (Martinová, 2006).

Calvo (2006) objasnil, že dominantním faktorem pro mechanismus formování kapek pomocí ultrazvuku je hodnota tzv. Ohnesorgova čísla (Ohnesorge, 1936; Husted, 2004) pro nebulizaci kapalin při dané hodnotě pracovní frekvence piezoelektrického měniče a velikosti vznikajících kapek.

Hodnota Ohnesorgeova čísla je dána rovnicí (32) a byla vypočtena pro různé organické kapaliny

$$Oh = \frac{\mu}{\sqrt{\rho \cdot \sigma \cdot D}}, \quad (32)$$

kde μ je dynamická viskozita [kg/m.s], σ je povrchové napětí [mN.m⁻¹], ρ je hustota [g.cm⁻³] a D je (i) 3 μ m, (ii) 6 μ m. (tab. 3), (Martinová, 2006).

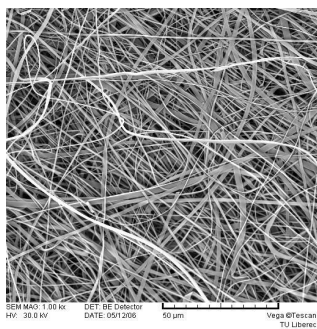
Kapalina	Kinematická viskozita [m ² /s]	Dynamická viskozita [kg/m . s]	Povrchové napětí [mN/m]	Hustota [kg/m ³]	Ohnesorge číslo	Tvorba aerosolu
Voda	0,001	1,0	72	1000	0,05-0,07	Ano
Aceton	0,0004101	0,324	23,3	790	0,03-0,04	Ano
Ethanol	0,001517	1,197	22,3	789	0,12-0,16	NE
Methanol	0,0007519	0,594	22,8	790	0,06-0,08	Ano
Toluen	0,0006747	0,585	28,4	867	0,05-0,07	Ano
Tetrachlor-Methan	0,00060978	0,972	25,9	1594	0,06-0,08	Ano*
Diethylether	0,0003408	0,242	16,96	710	0,02-0,04	Ano
Chloroform	0,000387	0,569	27,14	1470	0,04-0,05	Ano
Benzen	0,0007352	0,647	28,88	880	0,05-0,07	Ano
Isopropanol	0,002253	2,43	21,7	785,5	0,24-0,34	NE

Tab. 3 Vlastnosti vybraných kapalin a možnost jejich nebulizace
(Kinematická dynamická viskozita, povrchové napětí, hustota, Ohnesorgeovo číslo)

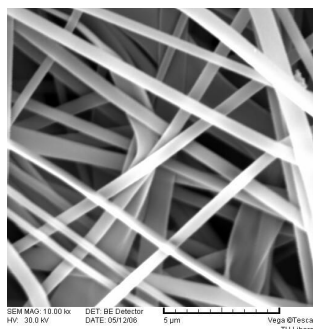
Z našich výsledků uvedených v tabulce 3 vyplývá, že přesáhne-li hodnota Ohnesorgeova čísla hodnotu 0,1, nedaří se vytvářet mlhu s pomocí piezoelektrického měniče s pracovní frekvencí 1,65 MHz.

12.4. Zvlákňování a nebulizace PAA

Nanovlákněná vrstva použitá v našem experimentu byla vytvořena kontinuálním způsobem na laboratorním modelu zařízení Nanospider z kyseliny polyakrylové-Sokalan 110 (BASF), s molekulovou hmotností 250 000 g.mol⁻¹. Kyselina byla částečně zneutralizována 25 % hydroxidem sodným, potom byla zředěna směsí ethanol/voda (1:1) hmot. na koncentraci přibližně 28 hmot. % a zvlákňována při napětí 55 kV, při vzdálenosti elektrod 0,1 m, teplotě roztoku 40 °C a relativní vlhkosti vzduchu 14,5 %. Jak je potvrzeno snímky SEM (obr. 49, 50), je zřejmé, že vznikající vlákna mají průměr většinou menší než 1 mikrometr.



*Obr. 49 PAA nanovlákná
po electrospinningu,
Mag. 1 000x*



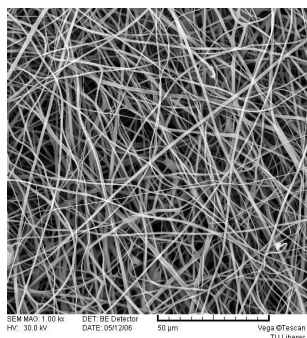
*Obr. 50 PAA nanovlákná
po electrospinningu,
Mag. 10 000x*

Pro vytvoření kovalentních vazeb mezi řetězci PAA byla opět využita nekatalyzovaná esterifikační reakce mezi karboxylovými skupinami PAA a hydroxylovými skupinami glycerolu.

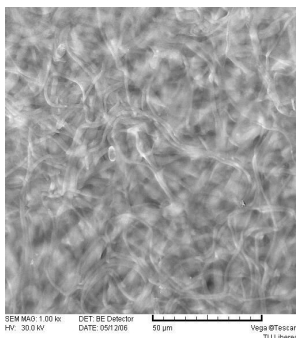
Roztok pro nebulizaci byl připraven dvoustupňově, nejprve byl připraven 70 % roztok glycerolu v methanolu, který byl následně zředěn acetonem na koncentraci 10 hmot. % glycerolu ve směsi aceton/methanol. Obsah 10 hmot. % glycerolu je maximální hodnota, kdy ještě dochází k nebulizaci směsi, jejíž jedna samostatná složka-glycerol, nebulizaci nepodléhá.

Nebulizace byla prováděna na laboratorním modelovém zařízení, jehož schéma je uvedeno na obr. 54, při laboratorní teplotě. Výška hladiny, která ovlivňuje vedle dalších parametrů výkon nebulizace, se pohybovala v rozmezí 30 ± 2 mm. Byla hodnocena účinnost nebulizace, vyjádřená jako úbytek kapaliny nad ultrazvukovým měničem za jednotku času. Tato hodnota je výrazně závislá na typu kapaliny, případně složení směsi kapalin. Při výše uvedené složení nebulizační směsi byly zjištěny hodnoty asi $11,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Takto efektivní průběh nebulizace umožňuje snížit dobu jejího průběhu až na 90 s, jak bylo experimentálně prokázáno.

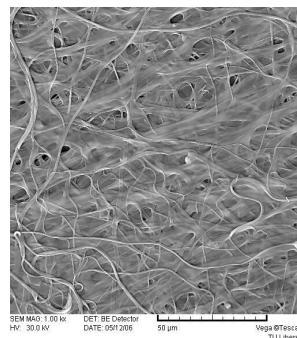
SEM snímek (obr. 51) potvrzuje, že nebulizační roztok ve složení aceton/methanol/glycerin je dostatečně inertní k nanovláknům vytvořených z PAA, což nelze dosáhnout při aplikaci roztoků vodných nebo s větším obsahem methanolu nebo ethanolu. Aceton je tedy vhodným nosičem sítujících komponenty a dobře nebulizovatelnou organickou kapalinou.



Obr. 51 PAA nanovláknna po nebulizaci , Mag. 1000x



Obr.52 PAA nanovláknna po 60 s nebulizaci a 12 hod v destil. vodě a následném usušení Mag.1000x



Obr. 53 PAA nanovláknna po 120 s nebulizaci a 12 hod v destil. vodě a následném usušení Mag. 1000x

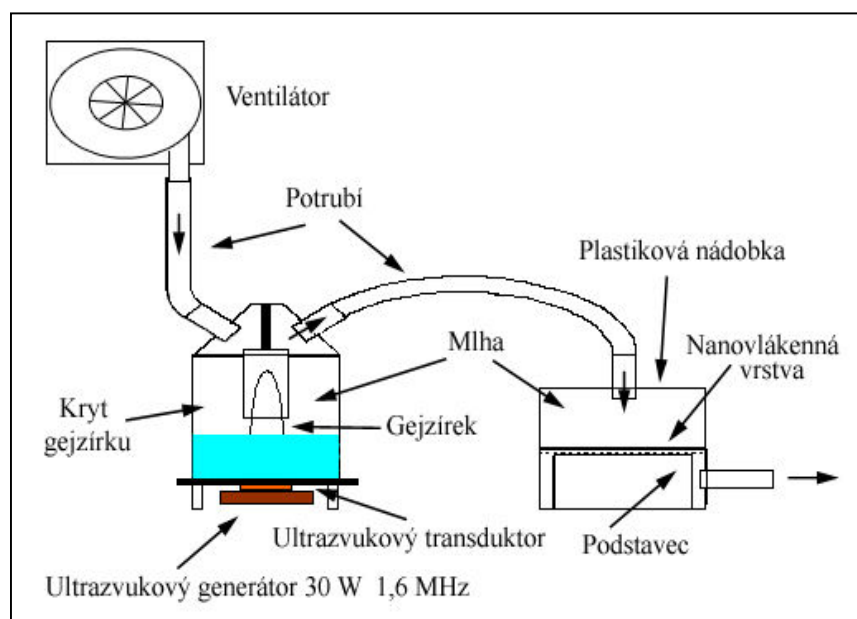
12.5. Laboratorní funkční model ultrazvukového nebulizéru

Pro šetrný nános síťujícího činidla na nanovláknennou vrstvu byl vytvořen speciální ultrazvukový nebulizér, který umožňuje tvorbu aerosolu bez velkých kapek. Využívá se při tom mechanické síly z oscilačního měniče, který zajišťuje přeměnu roztoku reagentie do relativně jednotných kapek.

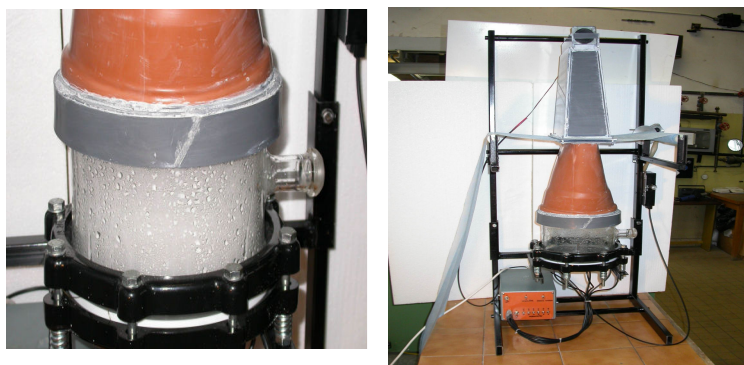
V průběhu našeho experimentu byly využívány dva nebulizéry s frekvencí ultrazvuku 1,65 MHz a 2,4 MHz a maximálním příkonem 30 W. První využívaná nádoba vyrobená z čírého polystyrenu však nedovolovala využití některých organických rozpouštědel, jak bylo zamýšleno. Proto byl v dalších krocích používán nebulizér s nádobou vyrobenou z nerezového plechu, ale se stejným měničem, pracujícím při frekvenci 1,65 MHz.

Při tvorbě aerosolu pomocí ultrazvuku dochází k uvolňování velkých kapek z okraje fontánky, které je třeba odstranit speciálním kónickým nebo plošným separátorem kapek. První funkční model našeho nebulizéru (Martinová, Hána, 2004), kde je vznikající aerosol transportován pomocí ventilátoru do uzavřené nádoby obsahující nanovláknennou vrstvu, je na obr. 54.

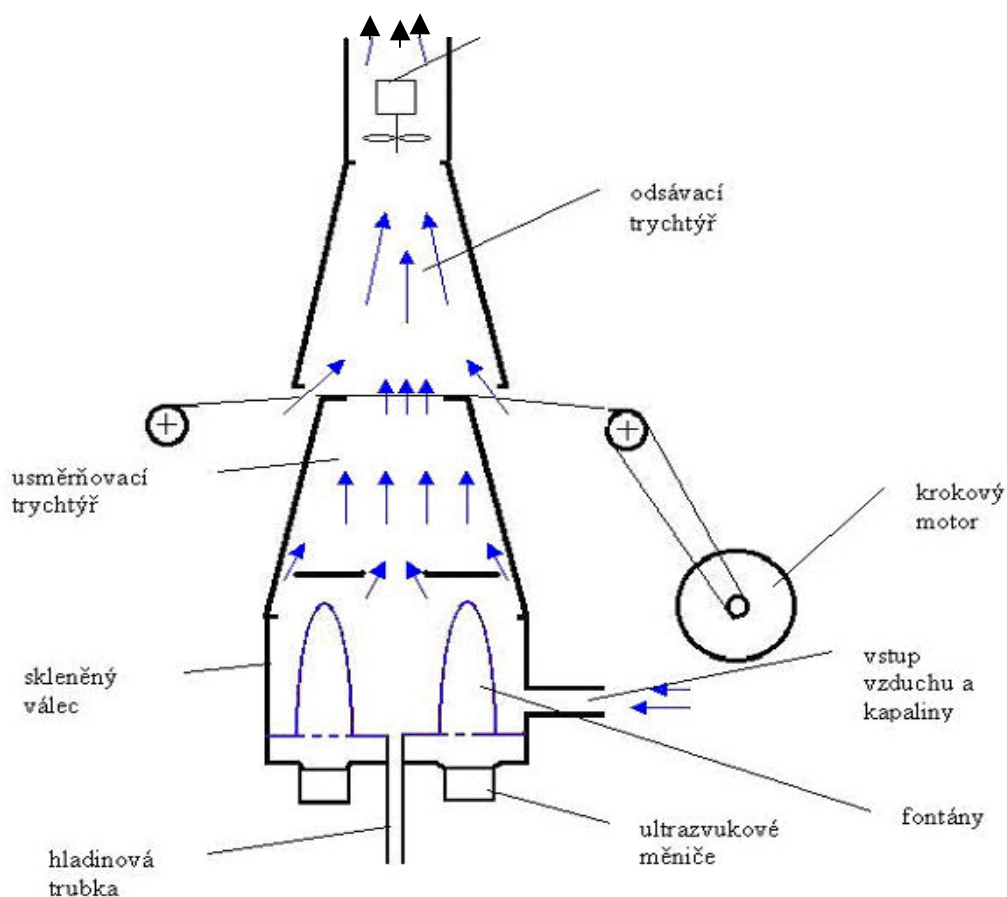
Po ověření účinnosti nebulizací vytvořené mlhy pro nános síťující komponenty pro nanovláknenné vrstvy byl zkonstruován 6x účinnější nebulizér (obr. 55, 56), (Pokorný, Martinová, 2007), který pracuje s šesti piezokeramickými měniči umístěnými v kruhu, jež mohou být zapojeny v libovolném počtu a pořadí. Intenzivnější tvorba mlhy umožňuje zkrácení doby působení spolu s řízeným kontinuálním posunem textili, a tím efektivnější průběh celé operace.



Obr. 54 Schéma prvního laboratorního ultrazvukového nebulizéru



Obr. 55 Foto laboratorního ultrazvukového nebulizéru “Mlhoš 3”



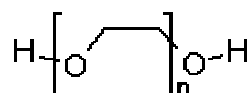
Obr. 56 Schema laboratorního nebulizeru "Mlhoš 3"

13. Polyethylenglykol a polyethylenoxid (PEG a PEO)

PEG je pozoruhodný materiál. Není toxický, je biokompatibilní a byl schválen FDA (US Federal Food Drug Administration) jak pro orální, tak pro lokální aplikace. PEO je další z řady vodorozpustných polymerů, který byl zvláknován metodou elektrostatického zvláknování. Možnosti jeho síťování byly studovány na fóliích i v nanovlákních.

13.1. Základní charakteristika PEO

Polyethylenglykol (PEG) a polyethylenoxid (PEO) jsou polymery s identickou strukturou a patří mezi komerčně nejdůležitější polyethery s obecným vzorcem ukázaným na obr. 57.



Obr. 57 Strukturní vzorec PEO,PEG

Název PEG nebo PEO se vztahuje k oligomerům nebo polymerům ethylenoxidu, jehož polymerizací jsou připraveny. V běžně přijímané usanci je polymer ethylenoxidu do molekulové hmotnosti $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ označován jako PEG, s molekulovou hmotností nad $10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jako PEO (Aldrich 2003).

PEG a PEO jsou kapaliny nebo nízkotavitelné pevné látky, jejichž teplota tání závisí na molekulové hmotnosti polymeru. Zatímco rozdílná molekulová hmotnost předurčuje PEG a PEO k různým aplikacím pro jejich různé fyzikální vlastnosti (např. viskozitu), jejich chemické vlastnosti jsou téměř identické.

Dífilní charakter PEO způsobuje, že je rozpustný jak v mnoha organických rozpouštědlech, např. methanolu, dichlormethanu, chloroformu a tetrahydrofuranu, tak ve vodě. Využívá se jako neionogenní povrchově aktivní látka. Hydrofilní charakter PEO je využíván ve fyziologických systémech. Je-li přítomen na povrchu, snižuje adsorpci proteinů a adhezi buněk. PEO má mnoho strukturních, chemických a fyzikálních vlastností blízkých extracelulární matrix v buňce. PEO je stále zkoumán pro využití v úpravě povrchů a objemových materiálů v biomedicínálních aplikacích, jak *in vitro*, tak *in vivo*, v cílené dopravě léků do organismu a v tkáňovém inženýrství. Sims a kol., (1996) uvádějí, že PEO může být využit na přípravu biokompatibilního scaffoldu, na kterém mohou proliferovat chondrocyty a vytvořit extracelulární matrix.

Polyethylenglykol je využíván v řadě běžných produktů, jako jsou např. laxativa, medicínské lubrikanty, kosmetické přípravky a odpěňovací prostředky.

PEG je rovněž často aplikován např. v zubních pastách jako dispergátor, též jako separátor a elektrolyt v lithiových elektrických článcích nebo jako stacionární fáze v plynové chromatografii. PEO nachází uplatnění i v tkáňovém inženýrství, kde se využívá jako bioaktivní nanohydrogel.

Klíčovou vlastností, která činí PEO atraktivní pro využití v biomateriálech, jsou biokompatibilita, hydrofilnost a jeho různorodost. Tento jednoduchý lineární polymer může být modifikován chemickou reakcí do formy ve vodě nerozpustného, ale botnatelného hydrogelu, s požadovanými vlastnostmi odvozenými z jeho strukturní jednotky. PEO se poprvé objevil v US Pharmacopoeia v roce 1950, od té doby je stále více využíván v různých farmaceutických aplikacích

Pro všechny výše uvedené vlastnosti se PEO stal předmětem našeho zájmu pro elektrostatické zvlákňování. Tím však vyvstal i problém síťování jako stabilizace PEO

proti rozpouštění ve vodném prostředí. S ohledem na chemickou strukturu PEO je zřejmé, že síťování polymeru bez funkčních skupin musí probíhat zcela jiným mechanismem.

13.2. Zvlákňování PEO

Je nasnadě, že jsme nejprve hledali procesní a materiálové podmínky pro elektrostatické zvlákňování PEO z vodného roztoku. Jako optimální molekulová hmotnost polymeru pro elektrostatické zvlákňování byly zjištěny hodnoty 200 000 a 400 000 g.mol⁻¹. Vodné roztoky PEO jsou bezproblémově elektrostaticky zvlákňitelné po úpravě vodivosti roztoku, např. pomocí NaCl na hodnotu cca 120 mS. Ve vodném roztoku není však rozpustný žádný z testovaných UV iniciátorů, které byly vybrány v souladu s experimenty, popsány např. Emanim a kol., 2002; Doytchevou, a kol., 2001; Sloopem a kol., 1994. V jejich pracích jsou uváděny UV iniciátory jako Darocur-1173 – 2-hydroxy-2-methylpropiofenon, benzofenon (BF), dibenzoylperoxid (DBP) a Luperox-101 – 2,5-bis(tetra-butylperoxy)-2,5 – dimethylhexan, který je jako jediný dobře mísitelný s vodným roztokem PEO. Společným rozpouštědlem pro PEO a uvedené UV iniciátory je např. chloroform. Naše experimenty však ukázaly, že toto rozpouštědlo dovoluje zvlákňování jen ve velmi omezeném čase, což je pravděpodobně důsledek velmi nízké hodnoty molární výparné enthalpie chloroformu, jež je 33,35 kJ.mol⁻¹, daleko méně ve srovnání s vodou – 44,01 kJ.mol⁻¹. Viskozita roztoku PEO v chloroformu se při elektrostatickém zvlákňování velmi rychle mění, řádově v desítkách sekund a následné ředění chloroformem již neumožňuje nastartování zvlákňování. Proto jsme hledali vhodné ko-rozpouštědlo pro PEO, které by umožňovalo uspokojivý průběh elektrostatického zvlákňování a zároveň by bylo i rozpouštědlem pro použité UV iniciátory. S ohledem na účinnost rozpouštědla a relativně nízkou toxicitu byla zvolena směs ethanol (EtOH)- chloroform, v objemovém poměru 3:1, neboli hmotnostním 1,6:1. Tato rozpouštědlová směs je nejen dobrým rozpouštědlem pro PEO, ale také pro benzofenon, který byl vyhodnocen po experimentech provedených na filmech jako nejúčinnější UV iniciátor pro PEO.

Pro zdůvodnění vhodnosti výše uvedené směsi rozpouštědel pro PEO, lze použít následující úvahu.

Hodnoty Hildebrantova parametru rozpustnosti (δ) pro PEO a některá rozpouštědla jsou shrnuty v tab. 4 (Vohlídal a kol., 1999).

Polymer, respektive rozpouštědlo	δ [J ^{1/2} . cm ^{-3/2}]
PEO	19,5 ± 1
PEO	18,75 (vypočteno dle vztahu (7))
Chloroform	19,0
Dichlormethan	19,85
Ethanol	26,2
Methanol	29,5
Aceton	20,3
Voda	48 ± 1

Tab. 4 Vybrané hodnoty Hildebrantova parametru rozpustnosti

Jednoduchým výpočtem podle hmotnostního zastoupení obou rozpouštědel spočteme, že výsledná hodnota rozpouštědlové směsi chloroform/ethanol je 23,4 J^{1/2} .cm^{-3/2}. Tato hodnota je výrazně bližší hodnotě δ pro PEO než hodnota δ pro čistý ethanol, ve kterém PEO rozpustný není.

Voda má nejvyšší hodnotu δ , která je důvodem pro větší obtíže při aplikování parametru rozpustnosti na vodné systémy (Frank, 1975).

Klasický formalismus pro parametr rozpustnosti se vztahuje k Floryho interakčnímu parametru pro polymery (χ) a k rozpustnostnímu parametru pro individuální komponenty podle Hildebrantovy rovnice (33), (Hake a kol., 2004),

$$\chi = V_{\text{pol}} (\delta_{\text{pol}} - \delta_s)^2 / k_B T \quad (33)$$

kde V_{pol} je polymerní objem a k_B je Boltzmanova konstanta. Indexy „pol“ a „s“ se vztahují k polymeru a k rozpouštědлу. Interakční parametr χ je bezrozměrný a jeho hodnota charakterizuje rozpouštěcí účinek rozpouštědla. Špatná rozpouštědla mají hodnoty interakčního parametru okolo 0,5 a více, zatímco lepší rozpouštědla mají interakční parametry menší (Graessley, 2004).

Souhrnné van der Waalsovy síly se reflektují v hodnotě Hildebrantova nebo Hansenova parametru rozpustnosti (δ), pro nepolární, respektive polární sloučeniny.

Kohezní energie se sestává z příspěvku disperzních sil δ_d , permanentních dipól-dipól interakcí δ_p a příspěvku vazeb vodíkovým můstkem δ_h , kde $\delta^2 = \delta_h^2 + \delta_d^2 + \delta_p^2$ (Frank, 1975).

Parametr rozpustnosti je prostředkem pro rychlou předpověď rozsahu interakcí mezi rozpouštědlem a rozpouštěnou látkou. Mísitelnost obou složek vzrůstá při podobnosti hodnot obou parametrů.

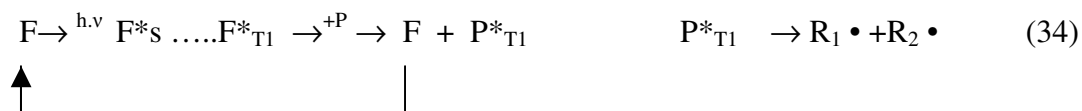
13.3. Síťování PEO

13.3.1. Fotoiniciace

Fotoiniciací se rozumí generace primárních radikálů pomocí záření. Molekula, nacházející se v základním, obvykle singletovém stavu S_0 se absorpcí kvanta UV záření během cca 1 fs elektronově excituje do vyššího, opět singletového stavu, a to prvního (S_1), druhého (S_2) atd., podle velikosti absorbovaného kvanta. Při návratu do stabilního základního singletového stavu, se excitované molekuly zbavují své nadbytečné energie fyzikálními relaxačními procesy, které mohou být doprovázeny též chemickými procesy, které vedou ke generaci radikálových aktivních center (Lapčík a kol., 1989).

13.3.2. Fotoiniciace s účastí fotosenzibilizátoru

Při fotosenzibilizované fotoiniciaci absorbuje primární záření molekula fotosenzibilizátoru. Z té se získaná excitační energie přenáší na molekulu polymeru, která se pak štěpí na makroradikálová reakční centra. Fotosenzibilizátor pak působí jako katalyzátor, který podstatně zvyšuje kvantový výtěžek fotoiniciace a tím i využití světelného příkonu.



Rychlost fotoiniciace je přímo úměrná množství záření absorbovaného fotosenzibilizátorem **F**, popř. polymerním řetězcem **P**, za jednotku času. Vznikají-li na jedno absorbované kvantum dva radikály, které se s iniciační účinností **f** přemění na růstová centra, bude pro v_i platit vztah

$$v_i = \left(\frac{d[R_1\bullet]}{dt} \right)_i = 2f - k_i \Phi_{\text{abs}} = 2f \cdot k_i \cdot (\Phi_0 - \Phi), \quad (35)$$

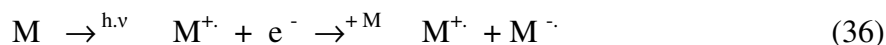
kde Φ_{abs} , Φ_0 a Φ jsou světelné toky zahrnující tok absorbovaný termosenzibilizátorem, primárního záření a prošlého záření. Podle Lambertova–Beerova zákona $\Phi = \Phi_0 \cdot e^{-\epsilon l [F]}$, kde ϵ je molární absorpční koeficient senzibilizátoru **F** a **l** je optická dráha.

Pro přímou fotoiniciaci platí stejný vztah, v němž místo **[F]** figuruje **[P]** a molární absorpční koeficient se vztahuje k monomeru.

13.3.3. *Přímá fotoiniciace*

Při přímé fotoiniciaci je iniciující záření absorbováno přímo molekulami polymeru. Použije-li se UV záření s $\lambda > 200$ nm, vznikají radikály fragmentací excitovaných molekul monomeru, jež je obdobou rozkladu fotoiniciátoru. Kvantové výtěžky přímých fotoiniciací však bývají malé.

Při použití vysokoenergetického záření s $\lambda < 200$, jako je UV, RTG, γ , může vedle fotoexcitace probíhat i fotoionizace molekul monomeru.



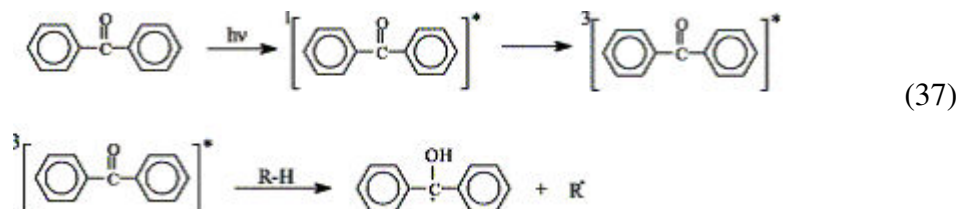
Při fotoiniciaci je z molekuly polymeru vyražen elektron, který je neschopen samostatné existence, a bývá zachycen jinou molekulou polymeru. Z prvé makromolekuly se stane kation-makroradikál, z druhé anion-makroradikál. Oba vzniklé ion-radikály mohou propagovat nejen radikálově, ale i iontově, a to zejména při nízkých reakčních teplotách. Při vyšších teplotách, kdy iontová centra bývají nestabilní, však jasně převažuje radikálová propagace.

13.3.4. *Výsledky síťování PEO*

13.3.4.1. *Síťování UV zářením*

Podmínky síťování PEO jsme sledovali nejdříve na připravených fóliích z PEO roztoku, následně v nanovlákných vrstvách. Jako zdroj iniciačního záření byla použita deuteriová lampa Heraeus Nobellight GmbH, typ 200F s výkonem 200 W, která podle údajů výrobce měla v inertním plynu produkovat UV záření v oblasti od 160 do 400 nm.

Pro iniciaci síťovací reakce (37) jsme použili benzofenon, po předchozím otestování několika dalších UV iniciátorů, uvedených v kapitole 13.2. Jeho triplet je rychle zhasen kyslíkem a může tak reagovat s vhodným vodíkovým donorem a vytvořit ketyl radikál. Ketyl radikál atakuje PEO řetězec, kde iniciuje vznik makroradikálu, který je schopen rekombinace s jiným makroradikálem za vzniku příčných vazeb mezi řetězci.



Ozařování nanovláknenných vrstev, jehož cílem bylo iniciovat síťovací reakci, probíhalo v dusíkové atmosféře. Byl vyšetřován vliv koncentrace iniciátoru, vzdálenosti lampy od vzorku a doby osvitu. Přestože doba osvitu byla prodlužována do technologicky neakceptovatelného maxima 1 hod, neproběhla síťovací reakce.

Druhým studovaným zdrojem iniciačního UV záření byla rtuťová výbojka s vlnovou délkou UV záření 254 nm a s výkonem 200 W, jejíž rozměr neumožňuje umístění do boxu s inertní atmosférou. Přesto se při osvitu v časovém intervalu od 30 do 60 s podařilo vyvolat síťovací reakci PEO nanovláken iniciovanou benzofenonem.

Vysvětlení uvedených skutečností může být následující. Relativní spektrální distribuce energie záření použité deuteriové lampy v intervalu vlnových délek 160 - 400 nm exponenciálně klesá a v oblasti kolem 250 nm dosahuje pouze zlomku hodnoty energie uváděné pro 160 nm. Uvážíme-li, že vazba C-C absorbuje záření o vlnové délce 195 nm a 230 až 250 nm, a energie vazby C-C je 335 kJ.mol⁻¹, je pravděpodobné, že energie záření lampy v této oblasti nebyla již dostatečná pro excitační iniciaci benzofenonu.

13.3.4.2. Síťování gama zářením

Síťování PEO bylo poprvé zrealizováno působením gama-záření na odplyněný vodný roztok (King, Warwick, 1966). Naší snahou bylo zrealizovat tento způsob síťování na nanovláknenných vrstvách, připravených z vodného roztoku PEO, které byly uloženy ve dvou ochranných PE obalech naplněných dusíkem. S ohledem na použitý vodný roztok PEO bylo možné aplikovat jako látku s iniciačním účinkem pouze Darocur 1173. Nanovláknenné vrstvy byly ozářeny ve firmě Bioster dávkami 0,1; 1; 5; 10 a 15 kGy.

Následně byla posouzena stabilita takto ošetřených vrstev ve vodě, při čemž byly porovnávány vrstvy bez obsahu UV iniciátoru s vrstvami s obsahem 1 hmot. % Darocuru 1173. Ozáření se na stabilitě vrstev téměř vůbec neprojevilo, určité velmi slabé náznaky protrahovaného rozpouštění byly pozorovány na vrstvách bez obsahu iniciátoru, což by naznačovalo, že příčné vazby mezi řetězci vznikly pouze v minimální koncentraci bez vlivu Darocuru 1173. Nanovlákněné vrstvy, které byly vystaveny dávce záření obvyklé pro běžnou sterilizaci chirurgických setů výrazně zkřehly účinkem degradace, jejich odolnost vůči vodě se však nezvýšila.

Z našich experimentů vyplývá, že vyvolání síťovací reakce PEO nanovláken účinkem gama záření nebylo úspěšné při žádné z aplikovaných dávek gama záření v atmosféře inertního plynu, a že pozitivní vliv Darocuru 1173 na síťovací reakci se prakticky neprojevil.

13. Závěr

Tato práce zdaleka nemohla zmapovat všechny systémy pro síťování vodorozpustných polymerů, jsou v ní však shrnuty všechny druhy polymerů a jejich síťovacích reakcí vyjma MDOC, kterými jsem se zabývala se svými studenty v uplynulých pěti letech. Tento projekt byl posléze rozšířen i na kontinuální elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků metodou Nanospider polymerů rozpustných v organických rozpouštědlech, které bylo zpočátku z důvodů technických a ekologických pro kontinuální realizaci odmítáno.

V této práci je podrobně popsána esterifikační reakce využitelná pro síťování PVA, PAA, MDOC, ale také pro síťování superabsorpčních polymerů na bázi částečně zneutralizované PAA. Receptura pro síťování PVA acetalizační reakcí, zmiňovaná v práci, je běžně využívána při stabilizaci PVA nanovlákných vrstev, aplikovaných např. při přípravě zvuko-izolačních kompozitů s obsahem nanovláken.

Nanovlákné vrstvy s obsahem chitosanu ve směsi s PVA, popřípadě PEO, jsou testovány na proliferaci chondrocytů in vitro a in vivo v Ústavu experimentální medicíny AV ČR, prozatím s velmi slibnými výsledky.

S rostoucí tendencí Katedry netkaných textilií spolupracovat s biomedicinálními pracovišti, je často volba zvlákňovaných polymerů, jejich směsí nebo kopolymerů určována právě požadavky těchto pracovišť. Některé z těchto polymerů, či jejich směsí, byly v této práci diskutovány, např. chitosan/PEO, chitosan/PVA, MDOC. Jiné polymery, např. kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), PEOEMA, nebo kopolymer HEMA a EOEMA, kterým je v poslední době v přípravě nanovlákných vrstev věnována velká pozornost, do této práce logicky nepatří. Nicméně např. studovaná problematika vlivu rozpouštědlového systému na průběh electrospinningu, na jemnost a kvalitu vytvářených vláken, vyjádřenou jako množství defektů, je obecně aplikovatelná na všechny zvlákňované polymerní roztoky.

Zjistili jsme, že rozpouštědla, či jejich směsi, mají na průběh electrospinningu značný vliv. Přídavkem vhodného ko-rozpouštědla lze významně ovlivnit jemnost vláken, zvýšit intenzitu zvlákňování, případně iniciovat vznik jejich řízené porézní struktury nebo dokonce průběh electrospinningu iniciovat. Těmto efektům bude v budoucnu věnována další pozornost, zvláště při přípravě porézních nanovláken.

Jak potvrzují SEM snímky, neodiskutovatelnou skutečností zůstává, že žádná ze síťovacích reakcí provedených na vodorozpustných polymerech, neumožňuje zachovat

zcela stejnou morfologii nanovláknenné vrstvy po ponoření do vody a následném usušení. Přestože zesíťovaná nanovláknenná vrstva je dokonale nerozpustná, je vždy dosaženo určitého nevratného nabotnění, a tím zvětšení průměrů vláken. Změna morfologie je v přímé souvislosti s koncentrací síťující komponenty. Dosud se nepodařilo navrhnout polymerní systém, který by umožňoval obojí. Uspokojivé elektrostatické zvláknění a zároveň dosažení zablokování všech hydrofilních skupin při průběhu síťovací reakce, které způsobují změnu morfologie vláken v součinnosti s vodou. V nanovláknenných vrstvách zůstávají ale zachovány póry dostatečné velikosti, které jsou pro biomedicínkové aplikace nezbytností. Bylo např. zjištěno, že při zvláknění směsi PVA/MDOC vláknenná vrstva vytvoří jemnou membránu, i když je na SEM snímcích viditelná původní vláknenná struktura. Přestože se potom nejedná v pravém smyslu slova o nanovláknennou vrstvu, experimenty prokázaly, že pro různé aplikace, kde jsou žádoucí hemostatické účinky, je plně vyhovující.

Stejný efekt byl pozorován u vrstev ze superabsorpčních polymerů. Přestože se mírně zvýší průměr vláken hned po prvním smočení do vody, při opakovaném namočení zůstává zachována extrémně rychlá kinetika sorpce. Ta je ve srovnání s komerčními SAP prášky i vlákny mnohem lepší u nanovláknenných vrstev s ohledem na jejich velký specifický povrch.

V souvislosti s touto prací bylo též navrženo a zkonstruováno zařízení pro nebulizaci kapalin účinkem ultrazvuku. Aplikace tohoto zařízení, které je schopno vytvořit kapky s průměrem kolem 3 mikrometrů, a to i z organických kapalin, nemusí být omezena jen na nános síťujícího činidla na nanovláknennou vrstvu, ale může stejně dobře posloužit např. pro nános redukující komponenty nebo enzymatického roztoku na textilní substrát. Intenzita produkované mlhy je při zapojení všech šesti piezoelektrických měničů značná a přitom dobře regulovatelná.

Z biomedicinných polymerů jsem se pak zabývala především chitosanem ve směsi s PVA nebo PEO a želatinou. Alespoň částečně bylo objasněno specifické chování polyelektrolytu v elektrostatickém poli, interakce polyelektrolytu se směsným polymerem a vliv nízkomolekulárního elektrolytu na průběh electrospinningu.

Velká pozornost byla věnována stabilizaci nanovláknenných vrstev z PEO. Mechanismus této reakce nevyužívá síťující činidlo s reagujícími funkčními skupinami ve smyslu jiných reakcí popsaných v této práci, a proto je ve srovnání s ostatními studovanými síťovacími systémy poněkud výjimečný. Pokud má být použit účinný UV iniciátor pro zesíťování nanovláken, je třeba se odklonit při elektrostatickém zvláknění

od vodného rozpouštědla, což je vždy spojeno s určitými komplikacemi. Testované UV iniciátory kromě Darocuru 1173, nejsou rozpustné ve vodě. PEO nanovláknennou vrstvu, zvlákněnou ze směsi chloroformu a ethanolu, se však podařilo zesíťovat účinkem benzofenonu excitovaného UV zářením.

Závěrem je třeba podotknout, že kontinuálně připravené nanovláknenné vrstvy v sobě skrývají značný potenciál, který je teprve postupně rozkrýván. Příprava těchto vrstev, takřkajíc na míru pro danou aplikaci, bude ještě dlouho zaměstnávat specialisty různých profesí.

15. Použitá literatura

- Aboumahmoud, R., Savello, P. (1990), Crosslinking of whey protein by transglutaminase, *J. Dairy Sci.* 73, 256-263.
- Agrawal, C.M., Ray, R. (2001), Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res.* 55,(2), 141.
- Ahmed, I., Nur-E-Kamal, A., Schindler, M., Meiners, S. (2005), Three dimensional nanofibrillar surfaces induce activation of Rac, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(2), 428-34.
- ALLTRACEL (2005), [online], [cit. 12.06.2005]. Dostupné z: <http://www.alltracel.com/en/altrcr20031111.pdf>.
- Babel, W. (1996), Gelatine-ein vielseitiges Biopolymer, *Chem. Unserer Zeit* 2,86-95.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A. Gurny, R. (2004), Structure and interaction in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical application, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* Jan 57 (1), 35-52.
- Bergshoef, M. M., Vancso, G.J. (1999), Transparent nanocomposites with ultrathin, electrospun Nylon-4,6 Fiber Reinforcem. *Adv. Mater.* 1999,11,1362-1365.
- Bhattacharai, N., Edmonson, D., Veseih, O., Matsen, F. A. (2005), Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, In: *Biomaterials* 26, 6176-6184.
- Biagini, G., Muzzarelli, R.A.A., Giardino, R., Castaldini, C. (1992), Biological materials for wound healing, In: C.J. Brine, P.A. Sandford, J.P. Zikakis (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan*, Vol 1, Elsevier Science, Barking, 16-24 Ueno, H., Mori, T., Bigi, A.G., Cojazzi, S., Panzavolta, N., Rubini, K. (2002), Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin, *Biomaterials* 23, 4827-4832.
- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. (1960), *Transport phenomenon*, J.Wiley, New York, p.780.
- Biskupičová, S. (2006), Vliv koncentrace MDOC ve směsi s PVA a vliv síťování na vlastnosti nanovlákněné vrstvy, Diplomová práce TUL.
- Bognitzki, M., Hou, H., Ishaque, M., Frese, T., Hellwig, M., Schwarte, C., Schaper, A., Wendorff, J., Greiner, A. (2000), Polymer metal and hybrid-nano-and mesotubes by coating of degradable polymer template fibers (Tuft Process), *Polym. Prepar. (Am. Chem. Soc., PMSE)*, 82,115.
- Bottoms, E., Cater, C.W., Shuster, S. (1966), Effect of ultra-violet irradiation on skin collagen, *Nature* 211 (1966), 97-98.
- Brandrup, J., Immergut, E.H. (1975), *Polymer Handbook*, 2. vyd. Wiley, New York.
- Brannon-Peppas, L. (1990), Harland, R.S. (1990), *Superabsorbent polymer technology*, Elsevier, Amsterdam.
- Buchholz, F. (1990), In *Superabsorbent polymer technology*, Brannon-Peppas, L. and Harland, R.S, Elsevier, 27-44.
- Burke, J. (1984), The Oakland Museum of California, August, Appeared in the AIC Book and Paper Group Annual. Vol, 3, Craig Jensen, Editor, 13-58, [online], [cit. 28.06.2007]. Dostupné z: <http://palimpsest.stanford.edu/byauth/burke/solpar/solpar2.html>
- Burness, D.M. (1965), Photographic composition containing epoxy hardening agents, US Pat. 3,189,459.
- Butler, M.F., Nug Y.F., Pudney, P.D.A. (2003), Swelling and thermal characteristics of genipin crosslinked chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) Hydrogels, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 41, 3941-3953.
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., Alfonso, M. J. (1997), Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsule as ocular carries, *Int. J. Pharm.* 153, 41-50.

- Cao, Z., Vacanti, J.P., Ma, P.X., Pakte, K.T., Upton, J., Langer, R., Vacanti, C.A (1995), Tissue engineering of tendon, Presented at: Mikos, A. et al., Polymer in Medicine and Pharmacy, Materials Society Symposium Proceedings, Pittsburgh, Pennsylvania, 394, 83.
- Casper, C.L., Stehen, J.S., Tassi, G., Chase, D.G., Rabolt, J.F. (2004), *Macromolecules* 37, 573-578.
- Clarke, J.B. (1984) *Eur.Pat.* 101,253.
- Crescenzi, V., Paradossi, G., Desideri, P., Dentici, M., Cavalieri, F., Amici, E., Lisi, R. (1997), New hydrogel based on carbohydrate and on carbohydrate-synthetic polymer network, *Polym. Gels Netw.* 5, 225-239.
- Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M. (1969), *Organická chemie*, SNTL, Praha.
- Davis, P., Tabor, B.E. (1963), Kinetic study of the crosslinking of gelatin by formaldehyde and glyoxal, *J. Polym. Sci., Part A: Polym.Chem.* Vol 1, 799-815.
- Dayal, P., Kyu, T. (2006), Porous fiber formation in polymer-solvent system undergoing solvent, *J.Appl. Phys.* 100, 043512/1-6.
- Dickinson, E. (1997), Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization, *Trends in Food Sci. and Technol.* 10, 334-339.
- Ding, B., Kim, H.K., Lee, S.Ch., Rae, D., Choi, K.J. (2002), Preparation and characterization of nanoscale poly(vinyl alcohol) fibers via electrospinning, *Fibers and Polym.* 3, 73-79.
- Doshi, J., Reneker, D.H. (1995), Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat.* 1995, 35, 151-160.
- Doytcheva, M., Dotcheva, D., Stamenova, R., Tsvetanov, CH. (2001), UV-initiated crosslinking of poly(ethylene oxide) with pentaerythritol triacrylate in solid state, *Macromol. Mater. and Eng.* Vol.286, Iss.1, 30-33.
- Draget, K.I., Varum, K.M., Moen, E., Gynnild, H., Smidsrod, O. (1992), Chitosan cross-linked with MO(IV) polyoxyanions- a new gelling system, *Biomater.* 13, 656-638.
- Drews, W.D. (1979), Flüssigkeitszerstäubung durch Ultraschall, *Electronic* 10, 83-87.
- Dumitriu, S., Vidal, P.F., Chornet, E. (1999), Hydrogely based on polycsacharides, in: Dumitriu, S. (Ed.), *Polycsacharides in Medicinal Application*, vol.1 Marcel Dekker, New York, pp.125-241.
- Eismenger, W. (1959), Dynamic properties of surface tension of water and aqueous solution of surface active afents with standing cappillary wales in the frequency range from 10 kHz to 1,5 MHz, *Acoustica* 9, 627-340.
- Eknadosyants, O.K. (1968), Role of cavitation in the proces soft liquid atomization in an ultrasonic fountain, *Sov. Phys.Acoust.* 14 (1), 80-84.
- Emani, S.H., Salovey, R., Hogen-Esch, T.E. (2002), Peroxide-mediated crosslinking of poly(ethylene oxide), *J. Polym. Sci.* 40, 3021-3026.
- Faergemand, M., Murray, B.S., Dickinson, E., Qvist, K.B. (1999a), Gross-linking of adsorbed kasein film with transglutaminase. *Int. Dairy J.* 9, 343-346.
- Faergemand, M., Sørensen, M.V., Jorgensen, U., Budolfsen, G., Qvist, K.B. (1999b), Transglutaminase, Effect on instrumental and sensory texture of set-style yoghurt. *Milchwissenschaft* 54, 563-566.
- Farbenfabriken Bayer A.-G. (1965), Verfahren zur Herstellung von wasserloeslichen, hochmolekularen Umwandlungsprodukten aus Gelatine oder ihren Hhydrolysenprodukten, *Ger.Pat.* 1,207,078.
- Fei, J., Gu, L. (2002), PVA/PAA thermo-crosslinking hydrogel fiber: preparation and pH-sensitive properties in elektrolyte solution, *Eur. Polym. J.* 38, 1653-1658.

- Felt, O., Carrel, A., Baehni, P. Buri, P., Gurny, R. (2000), Chitosan as tear substitute: A wetting agent endowed with antimicrobial efficacy, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 16, 261-270.
- Filová, E., Rampichová, M., Košťáková, E., Pánková, A., Martinová, L. Ocheretna, Lukáš, D., Lytvynets, A., Jelínek, F., Handl, M., Amler, E. (2006), Artificial scaffolds in cartilage regeneration, 82. Fyziologické dny, 7.2.-9.2.06, Praha, *Phys. Res.* 2006, 55(4) 19P
- Finch, C.A. (1973), *Polyvinyl Alcohol, Properties and Applications*, Wiley, New York.
- Firemní materiály firmy BASF Corporation (www.basf.com)
- Firemní materiály, Novácké chemické závody, Nováky, Slovensko.
- Formhals, A. (1934), Process and apparatus for preparing artificial threads, US Pat.1,975,504,1934.
- Formhals, A. (1939), Metod and apparatus for spinning, US Pat. 2,160,962.
- Formhals, A. (1940), Artificial thread and method of producing same, US Pat. 2,187,306.
- Formhals, A (1943), Production of artificial fibers from fiber forming liquids, US Pat. 2,323,025.
- Formhals, A. (1944), Metod and apparatus for apinning, US Pat. 2,349,950.
- Foulder, H.F. (1999), Electrical properties of composites in the vicinity of the percolation threshold, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol.72, Iss. 12, 1573-1582.
- Frank, F.W. (1975), *A comprehensive treatise*, Plenum Press, New York.
- Freed, L., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R.J., Eagles, D.B., Lesnoy, D.C.(1994), Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Bio-Technology*, 12, 1994, 689-693.
- Frish, H.L. (1956), In: F.R. Erich, Editor, *Treatise on rheology*, Vol 1, Academic Press, New York.
- Fuchs, E. (1961), *Adhäsion* 5, (5) 225.
- Fujimori, E. (1965), Ultraviolet light-induced change in collagen macromolecules, *Biopolymers* 3 (1965), 115-119.
- Fujinaga, T. (2001), Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 105-115.
- Gao, L.,Seliskar, C.J. (1998), Transparent poly(vinyl alcohol)-polyelectrolyte blends, *Chem.Mater* 10, 2481-2489.
- Gelita AG, Dissolution of gelatine, [online], [cit14.03.2007]
Dostupné z: <http://www.gelita.com>
- Geng, X., Kwon, O.H., Jang, J. (2005), Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution, *Biomaterials* Vol. 26, Iss. 27, 5427-5432.
- Geng, X., Kwon, O.H., Jang, J. (2005), Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution, *Biomaterials* Vol. 26, Iss. 27, 5427-5432.
- Gibson, P.W., Schreuder-Gibson, H.L., Rivin, D. (1999), R&D Note, Electrospun fiber mats: Transport properties, *AIChE J.* 45, 190-195.
- Gogins, M.A (2003), On-line web filtration efficiency test metod, US Pat. 5,203,201.
- Goissis, B., Marcantonio, R., Lia, D., De Carvalho, W. (1999), Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking *Biomaterials* 20, 27-34.
- Gourmand, M., Taupin, Y. (2000), *Nonwovens World*, Oct.-Nov., 73-83.
- Graessley, W.W. (2004), *Polymeric Liquids & Network: Structure and properties*, Garland Science, ISBN 0-8153-4169-5, New York.
- Guan, Y.L., Shao, L., Yao, K.D. (1996), A study, on correlation between water state and swelling kinetice of chitosan-based hydrogels, *J.Appl., Polym. Sci* 61, 2325-2335.

- Guan, Y.L., Shao, L., Yao, K.D. (1996), State of water in the pH-sensitive chitosan-polyether semi-IPN hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci* 61, 393-400.
- Gupta, P., Elkins, C., Long, T.E., Wilkes, G.L. (2005), Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fibers formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, *Polymer* 46, 4799-4810.
- Gustavson, K.H. (1956), *The chemistry of tanning processes*, Academic Press, New York, p. 253.
- Hakem, I.F., Lal, J., Bockstaller, M.R. (2004), Binding of monovanet ions to PEO in solution: Relevant parameters and structural transition, *Macromolecules* 37, 8431-8440.
- Hassan, C.M., Peppas, A.N. (2000), Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods, *Adv. Polym. Sci.* 153, 37-65.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L. (1998), In: Vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microsphere, *Int. J. Pharm.* 166, 75-88.
- Hildebrandt, J.H., Scott, R.L. (1950), *The solubility of non-electrolytes*, 3rd ed., Reinhold Publ Co, New York.
- Hirai, T., Sadato, H., Ueda, T., Kasazaki, T., Kurita, Y., Hirai, M. (1996), pH-induced Structure change of poly (vinyl alcohol) hydrogel crosslinked with poly (acrylic acid), *Angew. Makromol. Chem. Vol.* 240, Iss. 1, 213-219.
- Hirano, S., Yamaguchi, R., Fukui, N., Iwata, M. (1990), A chitosan, oxalate gel: its conversion to an N-acetylchitosan gel via a chitosan gel, *Carbohydr. Res.* 201, 145-149.
- Hojjati, E. (2001), Crosslinking PEO in the melt by means of 2,5-bis(tert-butylperoxy)-2,5-dimethylhexane, *US Pat.* 6,482,870.
- Holzmeister, A., Vogt, M., Placke, D., Greiner, A., Wendorff, J.H. (2006), Design of specific porous structure in electrospun nonwovens, Presented at: Status and Future of Nanofibers by Electrospinning and CNT-From Small to Smart, Oct. 23 -25, Frankfurt am Main, Germany.
- Holzmüller, W., Altenburg, K. (1966), *Fyzika polymerů*, SNTL Praha.
- Hon, D.N.S. (1996), *Polysaccharides in medical application*, Ed. Dumitru, Dekker, New York, 631-649.
- Huang, L., McMillan, R.A., Apkarian, R.P., Pourdeyhi, B. (2000), Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks, *Macromolecules*, 33, 2989-2997.
- Husted, B.P. (2004), The physics behind water mist systems, Presented at: IWMA conference 2004, 6-8 Oct. Rome, Italy, [online], [cit. 28.06.2007]
Dostupné z: http://www.dift.dk/media/Physics_behind_water_mist.pdf
- Chaigaud, B., Langer, R.S., Vacanti, J.P. (1997), The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells, Presented at: Atala, A., Money, D., *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*, Birkhäuser Boston, 1997, 1-14.
- Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R., Chiba, H. (1980), Crosslinking of casein components by transglutaminase, *Agric. Biol. Chem.* 44, 1567-1573.
- Ilford Ltd. (1963), Photographic developing compositions, *Brit. Pat.* 999,145.
- Ilford Ltd. (1966), Photographic developing compositions, *Brit. Pat.* 1,040,081.
- Irina, A., Varlamov, V.P. (2004), Hydrolysis of chitosan in lactic acid, *Appl. Biochem. Microbiol. Vol.* 40, 3, 300-303.

- Ito, A., Mase, A., Takizawa, Y., Shinki, M., Honda, H., Hata, K. (2003), Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering, *J. Biosci. Bioeng.* 9, (2), 196-199.
- Jacobson, M. (1991), The Nonwovens Industry meets the Filtration Business, *Nonwovens Industry*, May, 36-41.
- Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., Koombhongse, P., Rangkupan, R. and Supaphol, P. (2005), Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *Europ. Polym. Journal* 41, 3, 409-421.
- Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C. (2005), Effect of solvents on electrospinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *Eur. Polym. J.* Vol 41, Iss. 3, 409-421.
- Jing, W.H., Han, S.J. (1999), The interaction of chitosan-poly(ethylene glykol) in the presence of added salt in water: viscosity effect, *Eur. Polym. J.* Vol. 35, Iss. 11, 2079-2085.
- Jirsák, O., Sanetník, F., Lukáš, D., Kotek, V., Martinová, L., Chaloupek, J. (2003), CZ Pat. 94274 (B6), A method of nanofibers production from polymer solution using electrostatic spinning and device for carrying out the method, WO 2005024101.
- Juany, Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2003), A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Compos. Sci. Technol.* Vol. 63, Iss. 15, 223-2553.
- Kaplan, D.L., Wiley, B.J., Mayer, J.M., Arcidiacono, S., Keith, J., Lombardi, S., Ball, D. and Allen, A.L. (1994), Biosynthetic polysaccharides, In: *Biomedical Polymers* (S. Shalaby, ed.) Hanser Publisher, Munich and New York, 189-212.
- Kapřík, L., Pelikán, P., Čeppan, M. (1989), *Fotochemické procesy*, ALFA, Bratislava.
- Karavel, M.N., Domare, A. (1993), Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interaction with chitosan, *Biomaterials* 14, (12), 930-938.
- Kelvin Lord, T. (1871), Hydrokinetic solutions and observation, *Phil. Mag.*, 42, 362-377.
- Khalid, M.N., Ho, L., Agnely, J.L., Grossiord, J.L., Couarraze, G. (1999), Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network. Comparison with a chitosan reference gel, *STP Pharm. Sci* 9, 359-364.
- Khor, E. (1997), Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses, *Biomaterials* 18, 95-105.
- Kim, J.S., Reneker, D.H. (1999), Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers, *Polym. Compos.* 1999, 20, 124-131.
- Kim, S.S., Lee, Y.M., Cho, C.S. (1995), Synthesis and properties of semi-interpenetrating polymer network composed of β -chitin and poly(ethylene glykol) macromer, *Polymer* 36, 4497-4501.
- King, P.A., Warwick, N.Y. (1966), Ionizing radiation of water solution of polyalkylene oxide and product thereof, US Pat. 3,264,202.
- Klug, S., Merker, H.J., Jackh, R. (2001), Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis, *Toxicol. in vitro* 15, 6, 635-642.
- Koepff, P., Braumer, K., Babel, W. (1998), Biodegradable, water-resistant polymer material, US Pat. 5,733,994.
- Komárek, M., Martinová, L. (2006), Crosslinking of gelatin nanofibers, Presented at: *Fibermed*, 7-9th June, Tampere, Finland, ISBN 952-15-1606-2.

- Krach, A.M. (1958), *Manuf.Chemist* 29, 103.
- Kumeta, K., Nagashima, I., Mizoguchi, K., Matsui, S. (2003), Crosslinking reaction of poly (vinyl alcohol) by heat-treatment with poly (acrylic acid)-Effect of neutralization of PAA-J. of Appl. Polym. Sci. 90 (9) Nov 28, 2420-2427.
- Kuraray (1999), Mowiol Polyvinylalkohol, Clariant GmbH, Division CP, Sulzbach, Forschung und Entwicklung Polymerisate II.
- Kurihara, S., Sakamaki, S., Mogi, S., Nonaka, T. (1996), Crosslinking of poly (vinyl alcohol)-graft-N-isopropylacrylamide copolymer membranes with glutaraldehyde and permeation of solutes through the membranes, *Polymer* 37,1123-1128.
- Laleg, M., Pikulik, I. (1991), Wet-web strength increase by chitosan, *Nord. Pulp Paper, Res. J.* 9, 99-103.
- Lang, R. J. (1962), Ultrasonic Atomization of Liquids, *J. Acoust. Soc.Am* 34, (1), 6-8.
- Lapčík, L., Pelikán, P., Čepan.M. (1989), *Fotochemické procesy*, Alfa, Bratislava.
- Larrondo, L., Manley, R.St.J. (1981), Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties, *J. Polym. Sci., Part B: Polym.Phys.*19, 909-920.
- Lesny, P., Brynda, E., Martinova, L., Pradny, M., Houska, M., Riedel, T., Kysilka, J., Jendelova, P., Jirsak, O., Sykova, E. (2006), Polymers with modified surfaces for the treatment of spinal cord injury, Presented at: 4th Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Toronto, Canada.
- Liang, H.C., Chang, W. H., Lin, K.J and H.-W. Sung, H.W. (2003), Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies, *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* (2), 271-282.
- Liang, H.C., Chang, W.H., Liang, H.F., Lee, M.H. and Sung, H.W. (2004), Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 4017-4026.
- Lierke, E.G., Griesshammer, G. (1967), The formation of metal powders by ultrasonic atomization of molten metals, *Ultrasonic* 5, 224-228.
- Liu, J., Kumar, S. (2005), Microscopic polymer cups by electrospinning, *Polymer* 46, 3211-3214.
- Liu, X.F., Guan, Y.L. ,Yang, D.Z., Li, Z., Yao, Z.D. (2001), Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324-1335.
- Lozano, A., Barreras, F., Amaveda, H. (2003), High-frequency ultrasonic atomization with pulsed excitation, *J. Fluids Eng.* 125, 941-945.
- Martinová, L. (2006), Sonocatalysis and sonochemistry for SAP fibers, Task 5.1- Fifth semester, 6th Frame Work Programme ULTRATEC NMP2-CT- 2003-505 892.
- Martinová, L., Hána, P. (2004), Stabilization of Nanofibers using Ultrasonic Nebulizer, Presented at: Strutex 04, 11th Internat. Conference TU Liberec, December, p.165-168.
- Martinová, L., Pokorný, P. (2006), Crosslinking of nanofibers using ultrasonic generated mist, Presented at: 10th Meeting of the European Society of Sonochemistry, 4-8th Juny, Hamburg, Germany, p. 102.
- Martinová, L., Přádný, M. (2004), Nanofiber from the environmentally friendly polymers, Presented at: HPTEX 04, 7-9th July, Coimbatore, India, 27-33.
- Martinová, L., Přádný, M., Michálek, J. (2005), Polymer chemistry and electrospinning, Presented at: 37. Celostátní konf.koloristů, 25-27.10.05, Pardubice, 47-49.
- Mc Murry, J. (1984), *Organic Chemistry*, Brooks/ Cole Publ. Company, Ithaca.

- McCann, J.T., Li D., Marquez, M., Xia, Y. (2006), Nanostructured material by electrospinning, Presented at: Status and future of nanofibers by electrospinning and CNT—from small to smart, Oct. 23–25, Frankfurt am Main, Germany.
- m•doc™ –Technical specification (2006) [online], [cit.14.03.2007], Dostupné z: <http://www.stopbleedingfast.com/mdoc/>.
- Mi, F.L., Kuan, C.Y., Shyu, S.S., Lee, S.T., Chang, S.F. (2000), A novel thermally-activated crosslinking agent for chitosan, *Carbohydr. Polym.* 41, 389-396.
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S. (2000), Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38, 2804-2814.
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S. (2001), Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction, *J. Appl. Polym. Sci.* 81, 1700-1711.
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S. (2000), Synthesis and characterisation of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinkers, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38, 2804-2814.
- Michálek, J., Martinová, L., Přádný, M. (2005), Electrospinning of submicron fibers of selected watersoluble polymers, Presented at: Europolymer Conference „Polymer in Nanoscience and Nanotechnology“, Gargano, May 29-June 3, Italy.
- Min, B.M., Lee, G., Kim, S.H., Nam, Y.S., Lee, T.S., Park, W.H. (2004), Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, Mar-Apr, 25 (7-8), 1289-97.
- Min, B.M., Lee, S.W., Lim, J.N., You, Y., Lee, T.S., Kang, P.H., Park, W.H. (2004), Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers, *Polymer* Vol. 45, Iss. 21, 7337-7142.
- Monterio, O.A.C., Airolti, C. (1999), Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *Int. J. Biolog. Macromol.* 26, 119-128.
- Moore, G.K., Roberts, G.A.F. (1980), Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 1980, 2, 73-77.
- Morawetz, H. (1971), *Chování makromolekul v roztoku*, Academia, Praha.
- Motoki, M., Seguro, K. (1998), Transglutaminase and its use for food processing, *Trends in Food Sci. Technol.* 9, 204-210.
- Muzzarelli, R., Baldassara, V., Conti, F., Ferrari, P., Biagini, G., Gazzarelli, G.A., Vasi, V. (1988), Biological Activity of chitosan: Ultrastructural study, *Biomaterials* 9, 247-252.
- Needles, H.L. (1967), Crosslinking of Gelatin by Aqueous Peroxydisulfate, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* 1, 5, (1), 1-13.
- Oh, S., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. (1993), Characteristics of an immobilized form of transglutaminase: A possible in substrate specificity by selective interaction with a protein spacer, *J. Agric. Food Chem.* 41, 1337-1342.
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Hishida, A., Yamamoto, H. (2004), Electrospinning of Chitosan, In: *Macromolecular Rapid Communication*, Vol. 25, Iss. 18, 1600-1605.
- Ohnesorge, W. (1936), Die Bildung von Tröpfchen an Düsen und die Auflüssiger Strahlen, *Z. Angew. Math. Mech.* 16, 355-358.
- OKCEL®, 2007, Product information, [online], [cit.12.05.2005], Dostupné z: <http://www.synthesia.cz/en/products/by-sbu/nitrocellulose/oxycellulose-and-its-salts/>

- Okhawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H. (2004), Electrospinning of chitosan, *Macrom. Rapid Commun.* Vol 25, Iss. 10, 1600-1605.
- Okuyama, K., Wu, G., Jiravanichanun, N., Hongo, C. and Noguchi, K. (2006), Helical twists of collagen model peptides, *Biopolymers* 84, 421-432.
- Okuyama, K., Xu, X., Iguchi, M., Noguchi, K. (2006), Revision of collagen molecular structure, *Biopolymers* 84, 181-191.
- Peppas, N.A. (1986), Preface. In: Peppas (Ed.), *Hydrogels in medicine and pharmacy: Fundamentals*, Vol. 1, CRC Press. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Peppas, N.A. (1987), *Hydrogels in medicine and pharmacy*, Vol. 1, Polymers.
- Peppas, N.A. (1987), In: Peppas, N.A. (ed) *Hydrogels in medicine and pharmacy*, Vol. 1, Polymers, CRC, Boca Raton, FL, 1-48.
- Peter, M.G. (1995), Applications and environmental aspects of chitin and chitosan, *J. Macromol. Sci. A32*, 629-640.
- Platě, N. A., Litmanovitch, A. D., Noa, O. V. (1977), Makromolekulárne reakcie, *Chimija*, 35.
- Pouchlý, J. (2001), *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, VŠCHT Praha, ISBN 80-7080-422-X.
- Rampichová, M., Filová, E., Košťáková, E., Martinová, L., Ocheretna, L., Lukáš, D., Lytvynets, D., Amler, E. (2006), Non-woven PGA/PLA scaffolds in tissue engineering of cartilage, 82. Presented at: Fyziologické dny, 7.-9.2. 2006, Praha, *Phys Res.* 55(4): 39P.
- Rayleigh, L. (1883), On the crispation of fluid resting upon a vibrating support, *Phil. Mag.* 15, 50-58.
- Rayleigh, L. (1898), *Theory of sound*, II (Reprinted 1946, Dover Press).
- Rayleigh, L. (1917), On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity, *Phil. Mag.* 34 94-98.
- Rayleigh, L. (1982), *Philos. Mag.* 44, 184.
- Reneker, D.H., Yarin, A.L., Fong, H., Koozhongse, S. (2000), Charged Liquid of Polymer Solution in Electrospinning, *J. Appl. Phys.* 87, 4531-4547.
- Rho, K.S., Neony, L., Lee, G., Seo, B.M., Park, Y.J., Hong, S.D. (2006), Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*, Mar 27 (8), 1452-61.
- Risbud, M.V., Hardikar, A.A., Bhat, S.V., Bhonde, R.R. (2000), pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery, *J. Controlled Release* 68, 23-30.
- Robers, G.A., Tailor, K.E. (1989), Chitosan gels, The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde, *Macromol. Chem* 190, 951-960.
- Royal Society (2004), The Royal Society and Royal Academy of Engineering Nanotechnology, [online], [cit. 12.10.2007], Dostupné z: website [http:// www.nanotec.org.uk/](http://www.nanotec.org.uk/).
- Růžicková, J., Martinová, L., Řeháková, M., Jirsák, O. (2005), Electrospinning of chitosan nanofibers, Presented at: AMBIENCE 2005, 19-21 September, Tampere, Finsko.
- Sharma, R., Lorenzen, P.C., Qvist, K.B. (2001), Influence of transglutaminase treatment of skin milk on the formation of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking, *Int. Dairy J.* 11, 785-793.
- Shenoy, S.L., Bates, W.D., Frosh, H.L., Wnek, G.E. (2005), Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solution: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction, *Polymer* 46, Iss. 10, 25 April 3372-3384.

- Schindler, M., Ahmed, I., Kamal, J., Nur, E.K.A, Grafe, T.H., Young Chung, H. (2005), A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and orphogenesis for cells in culture, *Biomaterials* 26 (28), 5624-31.
- Schneider, B., Doskočilová, D. (1992), Struktura polymerů a metody jejího studia, Edice macro M-19, ÚMCH ČSAV, Praha, 67-77.
- Sims, C.D., Butler, P.E.N., Tasanova, R., Lee, B.T., Randolph, M.A., Lee, W.A., Vacanti, C.A., Yaremchuk, M.J. (1996), Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrates., *Plast. Reconstr. Surg.* 98, 843-852.
- Sindayihebura, D., Bolle, L. (1998), Ultrasonic atomization of liquid: Stability analysis of the viscous liquid film free surface, *Atomiz. Spray* 8, 217-233.
- Sloop, S.E., Lerner, M.M., Stephens, T.S., Tiptop, A.L. (1994), Cross-linking poly(ethylene oxide) and poly[oxyethylene-oligo(oxyethylene)] with ultraviolet radiation, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 53, 1563-1572.
- Söllner, K. (1936), Experiments to demonstrate cavitation caused by ultrasonic waves, *Trans. Faraday Soc.*, 32, 1537-1539.
- Sørensen, E. S., Rasmussen, L. K., Peterson, T. E. (1999), Component PP3 from bovine milk is a substrate for transglutaminase. Sequence location of putative cross-linking sites, *J. Dairy Res.* 66, 145-150.
- Sorokin, V.I. (1957), The effect of fountain at the surface of a vertical oscillating liquids, *Sov. Phys. Acoust.* 3, 281-291.
- Stevens, P.V. (1992), *Food Australia* 44(7):320-324, Described on Dr Bernard Cole's website [online], [cit.11.08.2005],
Dostupné z: <http://www.gelatin.co.za/gltln1.html>.
- Subbiah, T., Rumkumar, S.S. (2004), Polymeric nanofibers by electrospinning, Presented at: High Performance Textile and Apparels, HPTA, 7-9th July, Coimbatore, India, 81-90.
- Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G. F., Lin, H.Y. (2005), Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential application in cartilage tissue engineering, In: *J. Biomater. Sci.*, Vol. 16, 7, 861-873.
- Sung, H.W., Huang, H.W., Chang, R. N. Huang and Hsu, J.C. (1999), Biocompatible high-strength glue consisting of citric acid derivative and collagen, *J. Biomed. Mater. Res.* 46 (4), 520-530.
- Sung, H.W., Huang, R.N., Huang, L.L.H., Tsai, C.C. and Chiu, C.T. (1998), Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation, *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (4), 560-567.
- Sung, H.W., Huang, D. M., Chang, W.H., Huang, R. N. and Hsu, J. C. (1999), Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study, *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 520-530.
- Sykova, E., Hejcl, A., Martinova, L., Lesny, P., Brynda, Martinova, L., Pradny, M E., Jirsak, O., Michalek, J., Jendelova, P. (2006), Biocompatible scaffolds as 3D cell carriers and tissue bridges in spinal cord injury, Presented at: Society for Neuroscience annual meeting, Atlanta, Georgia, USA.
- Taylor, G.I. (1969), Electrically driven jets, *Proc. R. Soc. A*, 313, 453-457.
- Tlustá, H., Zelinger, J. (1971), Mísitelnost polymerů, *Chemické Listy* 65, 1143-1169.
- Tsuji, S., Musika, H., Itoh, M., Saga, J., Fujiwara, T., Hatsuda, T. (1990), An efficient preparation for superabsorbent polymers, *Eur. Pat.* 356,161.
- Tubbs, R.K. (1966), Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate), *J. Polym. Sci.*, A1, 4, 623-629.
- Vachoud, L., Zydowicz, N., Domard, A. (1997), Effect of physicochemical parameters on the formation of chitosan, *Carbohydr. Res.* 302, 169-177.

- Vohlídal, J. (1995), Makromolekulární chemie, skriptum UK Praha 1995.
- Vollmert, B. (1970), Základy makromolekulární chemie, Academia, naklad. ČSAV, Praha
- Vondráček, P. a kol., (1988), Metody studia a charakterizace struktury polymeru, VŠCHT, Praha.
- Wang, E., Overgaard, S.E., Scharer, J.M., Bols, N.C. a Moo-Young, M. (1988), Occlusion immobilization of hybridoma cells in chitosan, *Biotechnol. Tech.* 2, 133-136.
- Wang, H., Li, W., Wang, Z. (1997), Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer komplex. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semi-interpenetrating polymer network, *J. Appl. Polym. Sci* 65, 1445-450.
- Wang, M.Z., Qiang, J.C., Fang, Y., Hu, D.D., Cui, Y.L., Fu, X.G. (2000), Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) semi-IPN hydrogels, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38, 474-481.
- Wang, P.F., Wu, Sh.K., Shi, Y.Y., Deng, B.M., Sun, C. (1998), The aggregation behaviour of chitosan bioelectret in aqueous solution using a fluorescence probe, *J. of Material Sci* 33, 1753-1757.
- Ward, A.G., Courts, A. (1997), The science and technology of gelatin, Academic Press, London.
- Wood, W.R., Loomis, A.L. (1927), The physical and biological effect of high frequency, sound-waves of great intensity, *Philos. Mag.* 4 (22), 417-437.
- Wu, S.S. (1993), *Appl. Physicochem.: Part 1* (Gao Deng Jao Yu, House, Beijing), 102.
- Yang, F., Murugan, R., Wang, S., Ramakrishna, S. (2005), Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26(15), 2603-10.
- Yao, C.H., Liu, B.S., Chang, C.J., Hsu, S.H and Chen, Y.S. (2004), Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials, *Mater. Chem. Phys.* 83, 204-208.
- Yao, K.D., Peng, T., Goosen, M.F.A., Min, J.M., He, Y.Y. (1993), pH sensitivity of hydrogels based on complex forming chitosan:polyether interpenetrating polymer network, *J. Appl. Polym. Sci*, 48, 343-354.
- Yao, L., Haas, T.W., Guiseppi-Elie, A., Bowlin, G.L., Simpson, D.G., Wnek, G.E. (2003), Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly (vinyl alcohol), *Fibers Chem. Mat.* 15, 1860-1864.
- Yilmaz, H. (2002), Excess properties of alcohol- water system at 289,15 K, *Turk. J. Phys.*, 26, 243-246.
- Yin, Y.J., Zhao, F., Song, X.F., Yao, K.D., Lu, W.W., Leong, J.C. (2000), Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite, *J. Appl. Polym. Sci* 77, 2929-2938.
- Yule, A., Al Suleimani, Y. (2000), On droplet formation from capillary waves on a vibrating surface, *Proc. R. Soc. Lond. A*, 456, 1069-1085.
- Zaitse, T. (1996), Piezoelectric transformer convertor with PWM Control, *IEEE APEC Conference*, 279-283.
- Zeng, J., Hou, H., Wendorff, J.H. (2004), Electrospun PVA/PAA fibers with excellent water stability, *e-Polymers*, no.078.
- Zhang, Y.Z. Venugopal, J., Juany, Z.M., Lim, C.T., Ramakrishna, S. (2006), Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers, *Polymer*, Vol. 47, Iss. 8, 2911-2917.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J. (1995), Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing, *Appl. Mikrobiol. Biotechnol.* 44, 277-28.